

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur

Délivré par l'Université de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
Et de l'Institut Pasteur du Cambodge

Spécialité : Ecologie de la Santé

Présentée par Audrey Lacroix

**La détection et la caractérisation de
coronavirus et astrovirus chez les
chiroptères au Cambodge et au Laos**

Soutenue le 2 Décembre 2016 devant le jury composé de

Mr Christian DEVAUX, Pr, IRD

Rapporteur

Mr Jordi SERRA COBO, Pr, Université de Barcelone

Rapporteur

Mr Bernard GODELLE, Pr, Institut des Sciences de l'Evolution

Examineur

Mr Stéphane AULAGNIER, Pr, Université P. Sabatier, Toulouse

Examineur

Mme Aneta AFELT, PhD, Université de Varsovie

Examineur

Mr Roger FRUTOS, PhD, HDR, Université de Montpellier

Directeur de Thèse

Mr Philippe BUCHY, MD, PhD, HDR, GSK Vaccines R&D

Directeur de Thèse



La détection et la caractérisation de coronavirus et astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos

Detection and characterization of coronaviruses and astroviruses
in bats in Cambodia and Lao PDR

Audrey Lacroix

Octobre 2016

Université de Montpellier
Ecole doctorale GAIA
Institut Pasteur du Cambodge
Unité de Virologie
5 Monivong boulevard
PHNOM PENH - CAMBODGE

Résumé

Les zoonoses émergentes constituent un problème de santé publique majeur. A l'image des virus de l'immunodéficience humaine (VIH), influenza, ou encore Ebola, la plupart des pathogènes zoonotiques prennent leur origine chez la faune sauvage. Les chiroptères sont des réservoirs de virus zoonotiques qui peuvent provoquer des pathologies graves chez l'Homme, comme le virus de la rage ou le coronavirus responsable de la pandémie du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) en 2003-2004. En Asie du Sud-Est, reconnue comme un point chaud d'émergence, les chiroptères sont régulièrement en contact avec l'Homme du fait de l'exploitation des mêmes environnements et des activités de chasse et de consommation de ces animaux sauvages. Le risque de transmission de potentiels virus des chiroptères à l'Homme reste encore très peu étudié, notamment au Cambodge et au Laos. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse, qui a pour but de détecter et de caractériser des coronavirus et des astrovirus chez les chiroptères de ces deux pays, et d'explorer les environnements où le risque de transmission à l'Homme serait plus élevé.

Un premier axe de travail a porté sur la détection et la caractérisation de ces deux familles virales chez des chiroptères échantillonnés de 2010 à 2013. Une forte diversité de coronavirus et d'astrovirus a été détectée chez de nombreux genres de chiroptères insectivores et frugivores. De nouveaux hôtes réservoirs et de nouvelles souches virales ont été mis en évidence, dont certaines sont relativement proches de souches pathogènes chez l'Homme ou chez d'autres espèces animales. Le deuxième axe d'étude visait une caractérisation plus approfondie des virus. L'étude des protéines impliquées dans l'entrée cellulaire (protéines de capsid et de spicule pour les astrovirus et coronavirus respectivement), permet d'évaluer le potentiel de passage de la barrière d'espèce de ces virus. Plusieurs techniques de séquençage ont été tentées, en particulier au niveau des gènes d'intérêt. Les résultats ont été très limités, et n'ont pas permis une caractérisation approfondie des souches. Néanmoins, ce travail a mis en évidence les points critiques et les approches à envisager dans l'optique d'un futur séquençage de ces virus.

Enfin, le troisième axe de recherche a porté sur l'étude des facteurs environnementaux qui pourraient impacter les chiroptères et les potentiels virus zoonotiques qu'ils peuvent porter. Bien que les données aient été limitées, l'approche méthodologique et les pistes d'étude sont à retenir pour des études épidémiologiques futures. De plus les caractéristiques liées à la transformation des paysages naturels par l'Homme sont un aspect important à prendre en compte.

Mots clés: zoonoses, virus émergents, chiroptères, coronavirus, astrovirus, Cambodge, Laos

Abstract

Zoonoses are important public health issues, and represent 60% of emerging infectious diseases. Most of zoonotic pathogens originate from wildlife, such as the Human Immunodeficiency Virus, Influenza Virus or Ebola Virus. Chiroptera have been recognized as an important reservoir of zoonotic viruses, such as the lyssavirus or the coronavirus responsible for the pandemic of severe acute respiratory syndrome (SARS) in 2003-2004.

Southeast Asia is a hotspot for emerging diseases. Bats represent 30% of the biodiversity and are in close contact with human populations, due to the exploitation of the same environment and the use of bats as food in subsistence hunting. So far, there has been a lack of knowledge and understanding concerning the viruses circulating in the bat population in this region, especially in Cambodia and Lao P.D.R. The work presented in this thesis is dedicated to this problematic, with a special focus on the detection and molecular characterization of coronaviruses and astroviruses in bat populations in these two countries. The aim was also to depict environmental aspects which increase the risk of potential transmission from bats to humans.

The first part of this work was dedicated to the detection and typing of astroviruses and coronaviruses in bats collected over a three-year period throughout Cambodia and Lao P.D.R. A high diversity of these viruses was found in various insectivorous and frugivorous bats. New bat reservoirs and new potential virus strains were detected, including some related to strains known to be highly pathogenic for humans or livestock species.

The second part of this work therefore concentrates on a deeper characterization of the strains of interest, targeting genomic regions involved in cell host entry, and thus in ability to cross species barriers .

Several isolation and sequencing methods were implemented in order to characterize the regions of interest, *i.e.* capsid and spike proteins. Results were limited and did not permit a deeper characterization. Nevertheless, this work highlights the aspects which need to be improved in order to sequence the viruses more effectively.

The final part of this thesis examined environmental factors impacting the distribution pattern of bats, as well as the potential risk for virus transmission to humans. Transformation of landscape by humans from natural to cultivated lands, appeared to be important factors to take into account when investigating bat distribution, and the viruses they can harbor. Despite the weakness of the dataset, the methodological approach is worth being considered in further epidemiological studies on bat-associated viruses.

Key words:

zoonoses, emerging viruses, chiroptera, coronavirus, astrovirus, Cambodia, Lao PDR

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier particulièrement

le Dr Philippe Buchy (Dr. Med., PhD, HDR),
précédent responsable de l'unité de Virologie de l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC),
de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse à l'IPC,
d'avoir accepté le rôle de directeur de thèse,
de m'avoir encadrée et soutenue tout au long de ces quatre années,
pour ses conseils et ses encouragements;

le Pr Roger Frutos (PhD, HDR),
de l'université de Montpellier et Coopération Internationale pour la Recherche Agronomique et le Développement (CIRAD),
de m'avoir permis d'effectuer cette thèse entre Montpellier et Phnom Penh,
d'avoir accepté le rôle de directeur de thèse,
de m'avoir accueillie au sein du CIRAD et m'avoir donné l'opportunité de développer de nouvelles perspectives de recherche,
pour ses conseils et ses encouragements;

le Dr Philippe Buchy et le personnel de l'unité de virologie,
de m'avoir accueillie au sein de l'unité de virologie de l'IPC
et permis de faire ma thèse dans les meilleures conditions;

les Pr Vincent Deubel et Dr Didier Fontenille,
respectivement,
précédent et actuel directeurs de l'Institut Pasteur du Cambodge,
de m'avoir accueillie au sein de l'IPC,
et pour leurs soutiens et leurs encouragements;

le Dr Philippe Dussart (Dr. Pharma, PhD),
actuel responsable de l'unité de Virologie de l'Institut Pasteur du Cambodge,
pour son soutien durant la fin de ma thèse ;

le Dr Aneta Afelt (PhD),
de l'Institut de Géographie Physique, faculté de géographie et des études régionales de l'université de Varsovie, Pologne,
de m'avoir accueillie au sein de son unité,
d'avoir accepté de participer à mon jury,
et permis de développer de nouvelles compétences;

le Pr Christian Devaux,
de l'Institut pour la Recherche et le Développement,
pour avoir accepté le rôle de rapporteur de ce travail;

le Pr Jordi Serra Cobo,
du Département de biologie animale de l'Université de Barcelone et l'Institut de recherche pour la biodiversité (IRBio),
pour avoir accepté le rôle de rapporteur de ce travail;

le Pr Bernard Godelle,
de l'Institut des Sciences de l'Evolution,
d'avoir accepté de participer à mon jury;

le Pr. Stéphane Aulagnier,
de l'université Paul Sabatier de Toulouse,
d'avoir accepté de participer à mon jury;

l'ensemble du personnel de l'Institut Pasteur du Cambodge,
de m'avoir accueillie au sein de l'Institut durant ces 3 ans,
de m'avoir permis de faire partie intégrante de cette famille,
pour ce dynamisme, ces sourires, cette bonne humeur constante, et tout le soutien apporté;

l'IPC et le Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP),
de m'avoir permis de participer aux cours du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP) (Vientiane, 2013; Hong Kong, 2014),
et au Symposium scientifique du RIIP (Paris, octobre 2015),
qui ont été des temps forts de cette thèse, et des expériences professionnelles et humaines très enrichissantes.

A tous les membres de la famille de l'unité de virologie rencontrés pendant cette thèse, merci pour votre bonne humeur, votre patience, et votre sourire à toute épreuve! A Mme Sivuth, Veasna, Vibol, Serey Roth, Dara, Saraden, Sareth, Butnhin pour avoir assuré le bon fonctionnement du laboratoire et m'avoir épaulée dans les manipulations.

Je tiens à remercier également Jean-Dominique LeBreton et Julien Capelle pour m'avoir apporté une grande aide lors des analyses statistiques.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé dans la relecture de ce travail, et en particulier Sapho pour ta grande aide.

Merci à Julien et Pauline, pour votre générosité et votre accueil dans mes premiers mois à Phnom Penh.

Un très grand merci à Philippe et Josée Lhoste pour votre grande humanité et générosité, votre soutien précieux pour la dernière année de thèse.

Merci à toi Nicolas, pour l'aide précieuse que tu m'as toujours apportée à chaque galère informatique!

Je remercie mes parents, ma famille et les proches qui ont accepté mon choix, et soutenu depuis l'autre bout du monde ou de la France, pendant ces années de thèse.

A Léonie, pour tes lettres qui me suivent partout depuis tant d'années et qui m'apportent à chaque fois autant de joie. Ton optimisme, ta joie de vivre et ta force exceptionnelle m'impressionnent et m'inspirent toujours autant.

A mes vieilles branches d'Anne-sophie, Laurence, Elise, Elsa, Thibault, Stéphanie, Binôme pour ces amitiés bien enracinées. A tata Véro et tonton Sergio pour leurs soutiens.

A tous les amis phnom penhois, pour ces moments chouettes passés au Cambodge. Un clin d'oeil obligatoire à Lulu-Tango-Charlie, Roro, ma Sayon et José pour ces années de colocation inclassables par votre humour, votre bonne humeur, votre maladresse, votre grand coeur, vos tiques de langage inoubliables, votre cuisine que j'aurai parfois préféré oublier ;)

A Romain, Lucie, Artem, José et Sayonne, pour nos sessions sportivement sympathiques.

A Florence, pour cette belle et grande amitié née à Phnom Penh, merci tous ces bons moments et tous ces fous rires. Merci également pour ton aide et ton soutien dans les moments bien moins glorieux, et notamment lors mon épisode à trois pattes.

A toi Matthias, pour ton amour, ton soutien sans faille et ton optimisme en toute circonstance. Merci pour tous ces moments où tu m'as soutenue, portée, rassurée et bien plus encore. Merci de faire partie de ma vie.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Remerciements.....	5
Table des matières	9
Liste des figures	14
Liste des tableaux	16
Liste des articles.....	17
Liste des Annexes.....	18
Abréviations	19
 Introduction générale.....	 23
 Chapitre 1 : Partie bibliographique.....	 29
I. Le concept d'émergence des zoonoses virales	30
I. A. Les facteurs d'émergence des maladies infectieuses	31
I. B. Le concept de zoonose : l'émergence d'un agent pathogène animal dans la population humaine	36
I. C. L'Asie du Sud-Est, un point chaud pour l'émergence des zoonoses	38
I. D. Les zoonoses virales émergentes et leur impact en santé publique.....	40
I. D.1. Les hénipavirus	41
<i>I. D.1.a. L'épidémie du virus Hendra (1994).....</i>	<i>41</i>
<i>I. D.1. b. L'épidémie du virus Nipah.....</i>	<i>42</i>
I. D.2. La pandémie du SRAS	44
I. D.3. La prise de conscience de l'impact des zoonoses en santé publique	45
 II. Les chiroptères, un réservoir de virus zoonotiques	 49
II. A. Introduction générale sur les chiroptères	49
II. A.1. La vision des chiroptères à travers les cultures.....	49
II. A.2. Classification des chiroptères	52
II. A.3. Origine et histoire évolutive des chiroptères.....	55
II. A.4. Les chiroptères, des mammifères aux caractéristiques biologiques et écophysiologiques particulières	57

II. A.4.1. L'écholocation.....	58
II. A.4.1.a. La découverte de l'écholocation chez les chiroptères	58
II. A.4.1.b. Fonctionnement de l'écholocation chez les chiroptères.....	59
II. A.4.1.c. L'écholocation chez tous les chiroptères?	60
II. A.4.2. La capacité à voler	61
II. A.4.3. Un métabolisme et une longévité remarquables.....	63
II. A.4.3.a. Un métabolisme capable de réduire le stress oxydatif.....	64
II. A.4.3.b. Le contrôle de la température corporelle et du stress oxydatif par la torpeur et l'hibernation	65
II. A.5. Les chiroptères en Asie du Sud-Est	66
II. A.5.1. Le rôle écologique et économique des chiroptères en Asie du Sud-Est	67
II. A.5.1. a. Les chiroptères impliqués dans la pollinisation des angiospermes et dans la dispersion des graines	67
II. A.5.1.b. Les chiroptères contribuent au contrôle des populations d'insectes et ont un impact positif sur les forêts tropicales et la sylviculture	69
II. A.6. L'implication des chiroptères dans l'économie en Asie du Sud-Est.....	71
II. A.6. 1. Les chiroptères, une viande de brousse.....	71
II. A.6. 2. L'utilisation des chiroptères en médecine traditionnelle.....	72
II. A.6. 3. La récolte du guano issu des chiroptères permet la fertilisation des sols et est une source de revenu.....	72
II. A.6. 4. La valorisation touristique des chiroptères au Cambodge et au Laos	74
II. B. L'implication des chiroptères dans les zoonoses	75
II. B.1. L'histoire de la découverte des virus chez les chiroptères.....	75
II. B.2. Des caractéristiques biologiques et écologiques spécifiques aux chiroptères qui favorisent leur rôle de réservoir.....	75
II. B.2.1. Leur nombre	76
II. B.2.2. La capacité à transporter des virus sur de longues distances.....	76
II. B.2.3. La capacité à transmettre les virus	76
II. B.2.4. Leur longévité.....	77
II. B.2.5. La variation saisonnière des hôtes réservoirs	77
II. B.2.6. Les infections virales persistantes	78
II. B.3. L'immunité des chiroptères	79
II. B.3.1. L'aptitude à ne pas développer de symptômes.....	80
II. B.3.2. La présence de l'immunité innée	81
II. B.3.2. a. La détection du virus par l'hôte.....	81
II. B.3.2.b. La transduction du signal et activation des défenses immunitaires	82
II. B.3.3. le complexe du complément.....	85
II. B.3.3. La présence de l'immunité adaptative	86

II. B.3.3.a. Réponse immunitaire à médiation humorale.....	87
II. B.3.3.b. La réponse immunitaire à médiation cellulaire	88
II. B.3.3.c. Des preuves de la présence de cellules immunocompétentes.....	90
II. B.3.3.d. Des preuves de l'existence des molécules de signalisation	90
II. B.3.3.e. Un délais dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	91
III. Les astrovirus	92
III. A. Généralités sur le virus	92
III. B. Génome et cycle de réplication des Mamastrovirus	95
III. B.1. Composition du génome	95
III.B.2. Cycle de réplication	97
III. B.2.1 Entrée du virus dans la cellule.....	98
III. B.2.2. Multiplication du virus.....	98
III. B.2.3. Assemblage et sortie des virions	99
III. B.3. Des connaissances lacunaires sur l'entrée dans les cellules et la capacité d'infection des astrovirus	100
III. C. L'évolution de la classification des astrovirus	102
III. D. Les astrovirus chez les chiroptères	105
IV. Les coronavirus	109
IV. A. Généralités sur le virus	109
IV. B. Caractéristiques virologiques des coronavirus	111
IV. B.1. Les protéines de structure	111
IV. B.2. Les protéines non structurales	112
IV. B.3. Organisation du génome	113
IV. C. Le cycle de réplication des coronavirus.....	114
IV. C.1. L'entrée dans la cellule	114
IV. C.2. La réplication du virus.....	115
IV. C.2.1. La traduction primaire.....	115
IV. C.2. 2. La transcription de l'ARN viral.....	116
IV. C.2. 3. La traduction des ARNm (sg) en protéines et la formation de nouveaux virions	116
IV. C.3. La sortie du virus par exocytose	117
IV. D. Les coronavirus humains.....	118
IV. D.1. Pathologie des coronavirus humains (hors SRAS et MERS).....	118
IV. D.2. Aspects pathologiques du syndrome respiratoire aigu sévère chez l'Homme	119
IV. E. Les coronavirus d'origine animale	122
IV. E.1. Les coronavirus touchant les mammifères d'élevage.....	122

IV. E.2. La circulation des coronavirus chez les chiroptères.....	122
IV. F. Le potentiel zoonotique des coronavirus.....	126
IV. F.1. La capacité d'évolution des coronavirus	126
IV. F.2. La protéine S, protéine clé de l'entrée cellulaire : le rôle du clivage préliminaire et l'interaction avec le récepteur dans la transmission des coronavirus.....	127
IV. F.2.1. Chez le SRAS-CoV.....	128
IV. F.2.2. Chez le MERS-CoV	129
IV. F.2.3. Chez le CoV-HKU4, un coronavirus de chiroptère	130
IV. F.3. La capacité à se multiplier dans la cellule infectée	131
IV. G. Traitement et avancées thérapeutiques face au syndrome respiratoire aigu sévère.....	132
Chapitre 2 : La détection des coronavirus chez les chiroptères au Laos et au Cambodge	134
Contexte et objectif de l'étude	135
Principaux résultats	136
ARTICLE	139
Implications et perspectives	195
Implications	195
Limites et perspectives de l'étude.....	198
Conclusion de l'étude	199
Chapitre 3 : La détection des astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos	200
Contexte et objectif de l'étude	201
Principaux résultats	202
La circulation d'astrovirus chez les chiroptères au Laos et au Cambodge	202
L'analyse du polymorphisme chez les astrovirus	204
ARTICLE	204
Implications et perspectives	234
Chapitre 4: La caractérisation moléculaire des astrovirus et coronavirus : les limites et perspectives	237
Contexte et objectif de l'étude	238
Techniques mises en place	240
1. La culture cellulaire: un pré-requis au séquençage	240
Résultats	240
Conclusion et discussion	241
2. Séquençage de régions stratégiques du génome.....	243
2.1. Le choix des souches d'intérêt pour le séquençage	244

2.2. Le choix des amorces de séquençage : dégénérées, spécifiques, et oligo-d(T)	245
2.3. Séquençage du gène de la polymérase	246
2.4. Séquençage des gènes codant les protéines impliquées dans l'entrée cellulaire	247
2.4.a. Séquençage du spicule chez les coronavirus	247
2.4.b. Séquençage du gène de la capside chez les astVs	248
2.5. Résultats et discussion	250
3. Le séquençage à haut débit	254
Principes et objectifs	254
Résultats et discussion	258
Conclusion et perspectives	261
Perspectives concernant les astrovirus	262
Perspectives concernant les coronavirus	263
 Chapitre 5: Analyse de facteurs environnementaux potentiels liés à la présence des coronavirus et astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos	267
Contexte et objectif de l'étude	268
Principaux résultats	270
ARTICLES	272
Revue de la littérature	273
Manuscrit	297
Perspectives et conclusion	329
 Conclusion générale	333
 Annexes	337
Annexe 1	338
Annexe 2	343
Annexe 3	347
Annexe 4	348
Annexe 5	349
Annexe 6	352
 Bibliographie	354

Liste des figures

Figure 1 : Les différents facteurs de l'émergence de maladies zoonotiques.	35
Figure 2 : Le processus d'émergence d'une zoonose (modifié d'après Wolfe <i>et al.</i> 2007).	38
Figure 3 : Carte de la distribution des risques d'émergence de maladies infectieuses zoonotiques dans le monde. (d'après Jones <i>et al.</i> 2008).	40
Figure 4 : Les facteurs de l'émergence du virus Nipah.	48
Figure 5 : Exemples de la vision culturelle des chiroptères par l'Homme.	51
Figure 6 : L'avion III (l'Aiglon) créé par Clément Ader.	52
Figure 7 : Arbre phylogénétique simplifié des familles de chiroptères (modifié d'après Jones et Teeling 2006; Moratelli et Calisher 2015; Tsang <i>et al.</i> 2016).	53
Figure 8 : A gauche : Photographie du fossile d' <i>Onychonycteris finneyi</i> , le plus ancien fossile chiroptère retrouvé (Musée royal de l'Ontario). A droite : La représentation de la probable apparence de <i>O. finneyi</i> (Loana Riboli, 2008).	56
Figure 9 : Schéma illustrant l'évolution de la Pangée à l'échelle des temps géologiques.	57
Figure 10 : Les deux pionniers de la découverte de l'écholocation chez les chiroptères : Lazzaro Spallanzani (1729-1799) à gauche, Donald Griffin (1915-2003) à droite.	58
Figure 11 : Schéma simplifié de l'écholocation. Les chiroptères émettent des ondes ultrasons pour s'orienter et chasser leurs proies. En présence d'un obstacle ou d'une proie, les ondes sont réfléchies et l'écho, détecté par les chiroptères. Le délai entre l'émission et la réception de l'écho renseigne l'animal sur la distance de l'obstacle, et la déformation de l'écho, renseigne sur sa nature.	59
Figure 12 : Schéma comparatifs simplifié des os des membres antérieurs chez les Hommes (A), les oiseaux (B) et les chiroptères (C), (modifié d'après Cooper et Sears 2012).	62
Figure 13 : Exemple d'espèces de chiroptères pollinisateurs et pollinisateurs opportunistes appartenant à la famille des <i>Phyllostomidae</i> et des <i>Pteropodidae</i>	68
Figure 14 : Les fermes de guano au Cambodge : des palmiers abritant des colonies de <i>Scotophilus kuhlii</i> (A, B) dans une ferme de la province de Takeo. La collecte du guano au pied des arbres (C). Au Vietnam (D), les abris sont remplacés par des maisonnettes (source photos : Chhay Sokmanine, 2012).	74
Figure 15 : Schéma simplifié des mécanismes de la réponse immunitaire innée, identifiés chez les chiroptères.	84

Figure 16 : Schéma simplifié du mode d'action du complexe du complément dans la réponse immunitaire (RI).....	86
Figure 17 : Schéma simplifié de la réponse immunitaire à médiation humorale.	87
Figure 18 : Schéma simplifié de la réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	89
Figure 19 : Astrovirus en microscopie électronique. On distingue la morphologie caractéristique en étoile des virions (crédit photo : E. Bohl et L. J. Saif).	92
Figure 20 : Classification simplifiée des astrovirus de mammifères.....	94
Figure 21 : Schéma d'un génome d'astrovirus humain et des principales protéines.....	96
Figure 22 : Cycle de réplication des astrovirus (modifié d'après Mendéz <i>et al.</i>).	101
Figure 23 : Génome partiel de l'astrovirus AFCD337 isolé chez <i>Miniopterus pusillus</i>	105
Figure 24 : Coronavirus observés en microscopie électronique. (cliché : Fred Murphy, CDC).	109
Figure 25 : Classification phylogénétique simplifiée des coronavirus.....	110
Figure 26 : Schéma simplifié de la structure d'un beta-coronavirus.....	112
Figure 27 : Organisation schématique du génome d'un coronavirus.....	113
Figure 28 : Schéma du cycle de réplication du coronavirus.....	117
Figure 29 : Hypothèses sur l'origine et l'évolution des coronavirus.....	125
Figure 30 : Génomes des astrovirus et coronavirus et positions des gènes ciblés pour le séquençage et la caractérisation des virus (en rouge).	244
Figure 31 : Stratégie de séquençage d'une région du gène de la RdRp chez les coronavirus par RT-PCR nichée.....	246
Figure 32 : Stratégie de séquençage d'une région du gène du spicule chez les coronavirus par RT-PCR nichée.	249
Figure 33 : Stratégie de séquençage d'une région du gène de la capsid chez les astrovirus.....	250
Figure 34 : Arbre phylogénétique basé sur l'alignement de séquences de la RdRp chez les CoVs	251
Figure 35 : Résumé des techniques appliquées dans la préparation au séquençage à haut débit (HTS) des coronavirus.....	255
Figure 36 : Technique d'enrichissement viral par l'utilisation d'amorces spécifiques flanquées et du fragment de klenow.	256
Figure 37 : Technique d'enrichissement viral par l'utilisation du complexe de purification biotine/streptavidine.	257
Figure 38 : Principe de la purification par le complexe biotine/streptavidine (B/S).....	258

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des principaux facteurs impliqués dans l'émergence des maladies infectieuses zoonotiques, et quelques exemples de maladies associées.....	33
Tableau 2 : Les facteurs impliqués dans l'émergence du SRAS et de l'encéphalite à virus Nipah.	47
Tableau 3 : Vue générale de la diversité des chiroptères, par sous-ordre et par famille	54
Tableau 4 : Caractéristiques et rôles des différents types d'ondes émises par les chiroptères capables d'écholocation.....	60
Tableau 5 : Evolution de la classification des astrovirus.....	104
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des études menées sur les astrovirus de chiroptères, références et principaux résultats obtenus.	107
Tableau 7 : Récepteurs utilisés pour l'entrée de différentes souches de coronavirus dans leurs cellules cibles.....	115
Tableau 8 : Les souches de coronavirus circulant chez l'Homme.	121
Tableau 9 : Résultats concernant l'isolement des astrovirus et des coronavirus sur des cellules primaires de chiroptères.	241
Tableau 10 : Résultats de la stratégie d'enrichissement du génome viral par la technique (ii)	259
Tableau 11 : Récapitulatif des techniques employées pour le séquençage des astrovirus et coronavirus détectés chez les chiroptères au Cambodge et au Laos.	265

Liste des articles

Article 1 (Infection, Genetics and Evolution) _manuscrit soumis

Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia

Audrey Lacroix¹, Veasna Duong¹, Vibol Hul¹, Sorn San², Hull Davun², Keo Omaliss³, Sokha Chea⁴, Alexandre Hassanin⁵, Watthana Theppangna⁶, Soubanh Silithammavong⁶, Aneta Afelt⁷, Zoe Greateorex⁸, Amanda Fine⁹, Tracey Goldstein¹⁰, Lucy Keatts⁴, Roger Frutos^{11,12,#}, Philippe Buchy^{1,13#}

Article 2 (Infection, Genetics and Evolution)_manuscrit soumis

Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia

Audrey Lacroix¹, Veasna Duong¹, Vibol Hul¹, San Sorn², Davun Hull², Keo Omaliss³, Sokha Chea⁴, Watthana Theppangna⁵, Soubanh Silithammavong⁵, Alexandre Hassanin⁶, Aneta Afelt⁷, Amanda Fine⁹, Tracey Goldstein¹⁰, Zoe Greateorex⁸, Lucy Keatts⁴, Roger Frutos^{11,12,#}, Philippe Buchy^{1,13,#}

Revue de la littérature

Loss of forest habitats and its impact on bat populations in South East Asia: a literature review.

A. Lacroix, P. Buchy, R. Frutos, A. Afelt

Article 3 (EcoHealth)_manuscrit en cours de préparation

Analysis of environmental characteristics and the detection of coronaviruses and astroviruses in bat populations in Cambodia and Lao PDR.

Audrey Lacroix, Veasna Duong, Aneta Afelt, Wojciech Pokojski, Philippe Buchy, Roger Frutos

Liste des Annexes

Annexe 1	338
Annexe 2	343
Annexe 3	347
Annexe 4	348
Annexe 5	349
Annexe 6	352

Abréviations

aa	Acide aminé
ABLV	Australian Bat Lyssavirus
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNc sb	ADN complémentaire simple brin
ADNC db	ADN complémentaire double brin
ACE2	Enzyme de conversion 2 de l'angiotensine, récepteur cellulaire (en anglais : angiotensin converting enzyme 2)
ARN	Acide ribonucléique
ARN-	ARN de polarité négative
ARN+	ARN de polarité positive
ARNm	ARN messenger
ARNm (sg)	ARN messenger sous-génomique
ASE	Asie du Sud-Est
AstV	Astrovirus
bp	Paire de base nucléotidique
B/S	Biotine/Streptavidine
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIRAD	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CITES	Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction
CoV	Coronavirus
dCTP	désoxy-cytosine tri-phosphate
DPP4	Récepteur cellulaire dipeptidyl peptidase-4
ECP	Effet cythopathique

ERO	espèces réactives de l'oxygène
ExoN	Exoribonucléase
HeV	Virus Hendra
HTS	Séquençage à haut débit (en anglais : High Throuput Sequencing)
ICTV	Comité international sur la taxonomie des virus (en anglais : International Committee on Taxonomy of Viruses)
Ig	Immunoglobuline
IUCN	Union internationale pour la conservation de la nature
INFs	Interférons
IPC	Institut Pasteur du Cambodge
JEV	Virus de l'encéphalite japonaise
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton (unité de poids moléculaire)
Ma	Million(s) d'années
MAVS	Protéine de signalisation antivirale mitochondriale (en anglais: Mitochondrial Antiviral Signaling Protein)
NiV	Virus Nipah
nsp	Protéine non structurale
nt	Nucléotide
OIE	Office International des Epizooties
OMS	Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais)
ORF	Cadre de ouvert de lecture (en anglais : Open Reading Frame)
PRRs	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (en anglais : Pattern Recognition Receptors)
PAMPs	Motifs moléculaires associé aux pathogènes (en anglais : Pathogen Associated Molecular Patterns)
RBD	Domaine de liaison au récepteur (en anglais : Receptor Binding Domain)
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	Récepteur RIG-I (en anglais : Retinoacid Inductible Gene- Like Receptors)
RSI	Règlement sanitaire internationnal

SARS/ SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère
SL-CoV	SRAS-Like coronavirus
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SL-CoV	SRAS-Like coronavirus
STAT	Groupe de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et de facteurs de transcription (en anglais : Signal Transducers and Activators of Transcription)
Taq pol	Polymérase de la bactérie <i>Thermus aquaticus</i>
TLRs	Récepteurs de type Toll (en anglais : Toll-Like receptors)
TMPRSS	Protéase transmembranaire
UNICEF	Fonds des Nations unies pour l'enfance
USAID	Agence américaine pour le Développement international
Vero E6	Lignée de cellules épithéliales de rein de singe vert africain (<i>Chlorocebus</i> sp.)
vs.	Versus
WCS	Société pour la Conservation de la Vie sauvage (en anglais : Wildlife Conservation Society)
WHO	Organisation mondiale de la santé (en anglais : World Health Organization)

Introduction générale

Les zoonoses, maladies animales transmissibles à l'Homme, représentent près de 60% des maladies émergentes (Jones *et al.*, 2008). La plupart des zoonoses sont originaires de la faune sauvage, et plus particulièrement des rongeurs, des primates et des chiroptères. L'exploitation des territoires naturels pour le développement économique, agricole ou urbain, augmente les contacts entre les populations humaines et ces potentiels réservoirs sauvages, et ainsi le risque d'émergence de maladies zoonotiques (Jones *et al.*, 2013). Avec l'intensification des échanges internationaux, ces maladies peuvent se propager très rapidement et avoir des conséquences socio-économiques et sanitaires importantes (Morse, 2004, 1995; Wilson, 1995).

C'est dans ce contexte que le concept "une seule santé " a été créé en 2007 : il considère que les santés humaine, animale et environnementale sont liées et doivent être prises en compte dans l'appréhension des maladies émergentes. Il fut adopté officiellement en 2008 par six organisations internationales de premier plan, à savoir l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Office International des Epizooties (OIE), le Fonds des Nations unies pour l'enfance (UNICEF), la Banque mondiale et le bureau du Coordonnateur du système des Nations unies sur la grippe (UNSC) (Gibbs, 2014).

L'Asie du Sud Est (ASE), qui présente une forte biodiversité et de nombreux cas de proximité entre populations humaines et réservoirs sauvages, fait partie des zones à haut risque

d'émergence (Jones *et al.*, 2008). Elle connaît également un développement économique considérable et une modification rapide des paysages (Bloom et Williamson, 1998; Stibig *et al.*, 2014). Ces 20 dernières années, la région a vu l'émergence de plusieurs virus zoonotiques, comme le virus Nipah ou encore le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigüe sévère (SRAS), qui trouvent leur origine chez les chiroptères (Woolhouse, 2008; Daszak *et al.*, 2013). Les chiroptères représentent 21% des espèces de mammifères et sont ubiquitaires (Kunz et Fenton, 2005). Ils sont les réservoirs de nombreux virus zoonotiques émergents, comme les lyssavirus (virus de la rage), les filovirus (virus Ebola et Marburg), les hénipavirus (virus Nipah et Hendra) ou encore les coronavirus (virus du SRAS) (Calisher *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2015; Wang et Cowled, 2015).

Depuis la pandémie du SRAS, les recherches sur les chiroptères se sont multipliées en Asie. Une très forte diversité de coronavirus a été décrite chez un large panel d'espèces, incluant des souches appartenant au groupe des beta-coronavirus, qui comprend les souches zoonotiques responsables des syndromes respiratoires sévères (Lau *et al.*, 2013; Wacharapluesadee *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013, 2014, 2016; Chen *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016). Ces découvertes soulèvent l'importance de connaître leurs potentiels zoonotiques. Les mécanismes qui permettent aux coronavirus de franchir la barrière d'espèce, et d'être potentiellement infectieux pour l'Homme ont été décryptés (Li *et al.*, 2003; Wenhui Li *et al.*, 2005; Raj *et al.*, 2013). Ils représentent un axe de recherche à développer chez les coronavirus de chiroptères (Ren *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

D'autres familles virales ont été également détectées chez les chiroptères. Parmi elles, des astrovirus, qui semblent être présents de manière assez ubiquitaire (Chu *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2014). Les astrovirus sont responsables de gastro-entérites chez l'Homme et d'autres nombreuses espèces mammifères et aviaires (Matsui and Herrmann, 2003). La mise en évidence de la diversité génétique du virus, de co-

infections par différentes souches chez un même hôte et du fort potentiel de recombinaison des astrovirus indiquent que les transmissions inter-espèces et l'adaptation des astrovirus à de nouveaux hôtes semblent possibles (De Benedictis *et al.*, 2011; Wolfaardt *et al.*, 2011; Karlsson *et al.*, 2015). Ceci laisse présager l'émergence de nouveaux astrovirus infectant d'autres espèces, ou avec un potentiel zoonotique.

L'aire d'étude de ce travail de thèse présente une forte diversité de chiroptères, avec 70 espèces identifiées au Cambodge et 90 au Laos (Chheang *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2013). Leurs contacts fréquents avec les populations humaines, au travers de la chasse ou de l'exploitation des mêmes environnements, soulèvent la question du risque de potentielles transmissions de pathogènes zoonotiques à l'Homme. D'autres virus zoonotiques ont été mis en évidence chez des espèces synanthropiques et anthropophiles de rongeurs, comme les hantavirus et les arenavirus (Blasdell *et al.*, 2011, 2016). Cependant, les connaissances sur l'épidémiologie, le potentiel zoonotique ou encore la pathogénicité de potentiels virus chez les chiroptères restent très lacunaires (Salaün *et al.*, 1974; Olson *et al.*, 2002; Osborne *et al.*, 2003; Reynes *et al.*, 2004). Cette situation rend l'évaluation des risques et la mise en place de mesures de lutte adaptées difficiles, aussi bien en termes d'actions, de prévention que de traitements.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse, en se focalisant sur la détection, l'identification et la caractérisation moléculaire de deux familles de virus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos, à savoir les astrovirus et les coronavirus. La recherche et l'identification des zones qui présentent un haut risque de transmission entre les hôtes chiroptères et les populations humaines, fait également partie de ce projet de thèse. En outre,

ce travail de recherche s'efforce d'identifier la circulation éventuelle de ces virus chez ces hôtes, de les localiser, et d'en établir les caractéristiques en termes de phylogénie et de pouvoir pathogène éventuel pour l'Homme.

Le premier chapitre de ce manuscrit décrit le concept d'émergence et les principaux facteurs d'apparition des zoonoses émergentes, et expose les mesures dans lesquelles les chiroptères peuvent être considérés comme des réservoirs de pathogènes zoonotiques efficaces. Les caractéristiques générales et la pathogénicité des deux familles virales étudiées dans cette thèse sont également présentées.

La première partie du travail de thèse s'est inscrit dans le projet "PREDICT", lancé en 2010 par l'Agence américaine pour le Développement international (USAID), qui a pour but de rechercher et d'identifier de nouvelles maladies zoonotiques chez les chauves-souris, les rongeurs et les primates non-humains dans les régions à haut risque d'émergence. En Asie du Sud Est, l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC) et la Société pour la Conservation de la Vie sauvage (WCS) sont partenaires du projet. Entre 2010 et 2014, des milliers d'échantillons ont été collectés chez divers mammifères à travers le Cambodge et le Laos par la Société de conservation pour la faune sauvage (WCS) et testés à l'IPC pour la présence de familles virales potentiellement zoonotiques. Mon travail a porté sur la détection, l'identification et la caractérisation moléculaire des astrovirus et coronavirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos.

Le deuxième chapitre de thèse est consacré à l'étude de la détection et la caractérisation des coronavirus. Il s'agit de la première investigation menée sur les coronavirus de chiroptères dans cette zone d'étude. La circulation de coronavirus chez ces animaux a été mise en

évidence par diagnostic moléculaire et l'analyse des séquences obtenues a permis d'établir une première caractérisation phylogénétique des virus détectés. Ce travail a fait l'objet d'un premier article soumis au journal *Infections Genetics and Evolution* (IGE) le 1^{er} Août 2016 (Lacroix A., Duong V., Hul V., Sorn S., Holl D., Omaliss K., Chea S., Hassanin A., Theppangna W., Silithammavong S., Afelt A., Grotorex Z., Fine A.E., Goldstein T., Keatts L., Frutos R., Buchy P. Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia). Il a également fait l'objet de trois communications lors de conférences scientifiques internationales : deux présentations orales en 2014 et en 2015 (*12th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases*, Bangkok, Décembre 2014; *Symposium scientifique du réseau international des Instituts Pasteur*, Paris, Octobre 2015), ainsi qu'un poster scientifique (*64ème meeting annuel de l'ASTMH, American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Philadelphie, Octobre 2015).

Le troisième chapitre porte sur la mise en évidence de la présence du virus chez ces hôtes au Cambodge et au Laos, et la détection du fort degré de polymorphisme chez ces virus. De nouveaux hôtes chiroptères ont été détectés et une nouvelle espèce d'astrovirus a aussi été décrite chez un chiroptère frugivore. C'est la première étude qui décrit la circulation et le polymorphisme des astrovirus dans cette zone d'étude et sur un vaste panel de genres de chiroptères. Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit récemment soumis au journal IGE en septembre 2016. (Lacroix A., Duong V., Hul V., Sorn S., Holl D., Keo Omaliss, Chea S., Theppangna W., Silithammavong A., Hassanin A., Afelt A., Fine A.E., Goldstein T., Joly D.O., Grotorex Z.F., Keatts L., Frutos R., Buchy P. Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia).

Un deuxième axe de travail a porté sur une caractérisation moléculaire plus approfondie des coronavirus et astrovirus détectés. Nous nous sommes focalisés sur la caractérisation des zones du génome impliquées dans l'entrée des virus dans les cellules hôtes, et par conséquent impliqués dans le passage de la barrière d'espèce. De nombreuses techniques de caractérisation ont été mises en place, avec des résultats très limités, ne permettant pas d'effectuer une caractérisation en profondeur des virus. Cependant, la mise en place des différentes techniques a permis de mettre en avant les conditions limitantes et les points critiques à améliorer pour le séquençage de tels virus. L'ensemble du travail est présenté dans le quatrième chapitre de ce manuscrit.

Enfin, face à la diversité des genres de chiroptères collectés et à leur écologie, il semblait intéressant d'explorer les paramètres environnementaux qui pourraient influencer sur le risque de transmission de virus entre ces hôtes et les populations humaines. Le dernier axe de travail a porté sur l'étude d'éventuelles corrélations entre les caractéristiques environnementales, dans les zones où les chiroptères ont été échantillonnés, et la présence des virus chez les différents genres de chiroptères. Cette étude s'est basée sur les données épidémiologiques associées aux échantillons collectés (chapitres 2 et 3) ainsi que sur le traitement de données environnementales par le système d'information géographique. L'échantillonnage irrégulier et hétérogène à disposition ont limité l'analyse, cependant l'approche méthodologique qui a été développée et pourrait être utilisée pour la mise en place de futures études épidémiologiques sur ces hôtes. Ce travail fera l'objet de l'écriture d'un article qui sera soumis au journal *EcoHealth*, dès que les données relatives à la détection des coronavirus et astrovirus chez les chiroptères auront été rendues publiques. L'ensemble de ce travail est présenté dans le cinquième et dernier chapitre de ce manuscrit.

Chapitre 1 : Partie bibliographique

I. Le concept d'émergence des zoonoses virales

Les maladies émergentes sont définies par l'Office International des Epizooties (OIE) comme des infections nouvelles causées par l'apparition ou la modification de l'épidémiologie d'un agent pathogène existant au sein d'une population. Ce phénomène existe depuis longtemps et semble s'être intensifié au cours du dernier siècle : depuis les années 1940, plus de 300 maladies infectieuses ont émergé ou ré-émergé à travers le monde (Jones *et al.* 2008). Les zoonoses, maladies animales transmissibles à l'Homme, représentent près de 60% d'entre elles. Parmi ces zoonoses, 72% trouvent leur origine dans la faune sauvage (Jones *et al.*, 2008), principalement chez les rongeurs, les primates, les chiroptères, ainsi que chez d'autres espèces mammifères et non-mammifères (Woolhouse et Gowtage-Suequera, 2005).

Environ un tiers des pathogènes responsables des maladies émergentes sont d'origine virale (Jones *et al.*, 2008). De nombreux virus issus de la faune sauvage ont été impliqués dans les récents épisodes épidémiques et pandémiques, comme ceux liés au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), au coronavirus associé au syndrome respiratoire aigüe sévère (SRAS) ou encore du virus Ebola. Depuis sa découverte, il est estimé que le VIH aurait infecté 78 millions et tué 35 millions de personnes (UNAIDS, 2016). La récente épidémie de virus Ebola a touché 28 600 personnes (dont 11 310 décès) en Afrique de l'Ouest entre fin 2013 et 2015 (WHO, 2016). La vue de ces chiffres, et l'expérience de ces zoonoses, nous rappellent à quel point le concept de " une seule santé ", en anglais " One Health ", qui vise à renforcer les liens entre santé publique humaine, animale et gestion environnementale, n'a jamais été autant d'actualité.

Cette partie vise à exposer les différents facteurs intervenant dans l'émergence des maladies infectieuses de façon générale, pour ensuite se centrer sur la description des différents stades d'apparition des zoonoses, illustrés par des exemples de zoonoses virales. Ceci nous permettra de comprendre les raisons pour lesquelles l'Asie du Sud-Est (ASE) représente un point chaud d'émergence de zoonoses.

I. A. Les facteurs d'émergence des maladies infectieuses

Les populations animales sauvages constituent un réservoir d'agents infectieux important et fournissent, selon Morse (1995), un "pool zoonotique" à partir duquel les agents pathogènes, jusqu'alors inconnus chez l'Homme, peuvent émerger (Morse, 1995; Chomel *et al.*, 2007). Ces agents pathogènes peuvent être des bactéries, des virus ou des prions, des protozoaires, des champignons ou des helminthes (Cleaveland *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008).

Dans une étude portant sur 1 415 agents infectieux, Taylor *et al.* (2001) démontrent que 50% des bactéries, 76% des virus ou prions, 65% des protozoaires, 38% des champignons et 95% des helminthes responsables de pathologies humaines, sont des agents pathogènes d'origine zoonotique (Taylor *et al.*, 2001).

Déjà en 1992, Lederberg et ses collaborateurs évoquaient les principaux facteurs contribuant à l'émergence des maladies infectieuses chez l'Homme sur le territoire américain (table 1, figure 1). L'augmentation de la population humaine, ainsi que des activités économiques, l'urbanisation, la déforestation et l'intensification des activités agricoles, modifient les paysages et l'aire de répartition des animaux sauvages. Ces phénomènes augmentent l'interface entre l'Homme et les populations animales sauvages qui peuvent être le réservoir d'agent infectieux. Ils décrivent l'ensemble de ces changements comme un "pont

épidémiologique" facilitant le contact entre les agents zoonotiques et les populations humaines "naïves" (Lederberg *et al.*, 1992).

Ces facteurs sont identifiés et longuement analysés au fur et à mesure des cas d'épidémies et de pandémies (Table 1) (Barrett *et al.*, 1998; Desselberger, 2000; Taylor *et al.*, 2001; Morens *et al.*, 2004; Morse, 2004; Cleaveland *et al.*, 2007; Wolfe *et al.*, 2007; Woolhouse *et al.*, 2008). Un nouveau facteur a récemment été identifié comme jouant un rôle dans l'émergence de maladies : celui du changement climatique (Patz *et al.*, 1996; Khasnis et Nettleman, 2005).

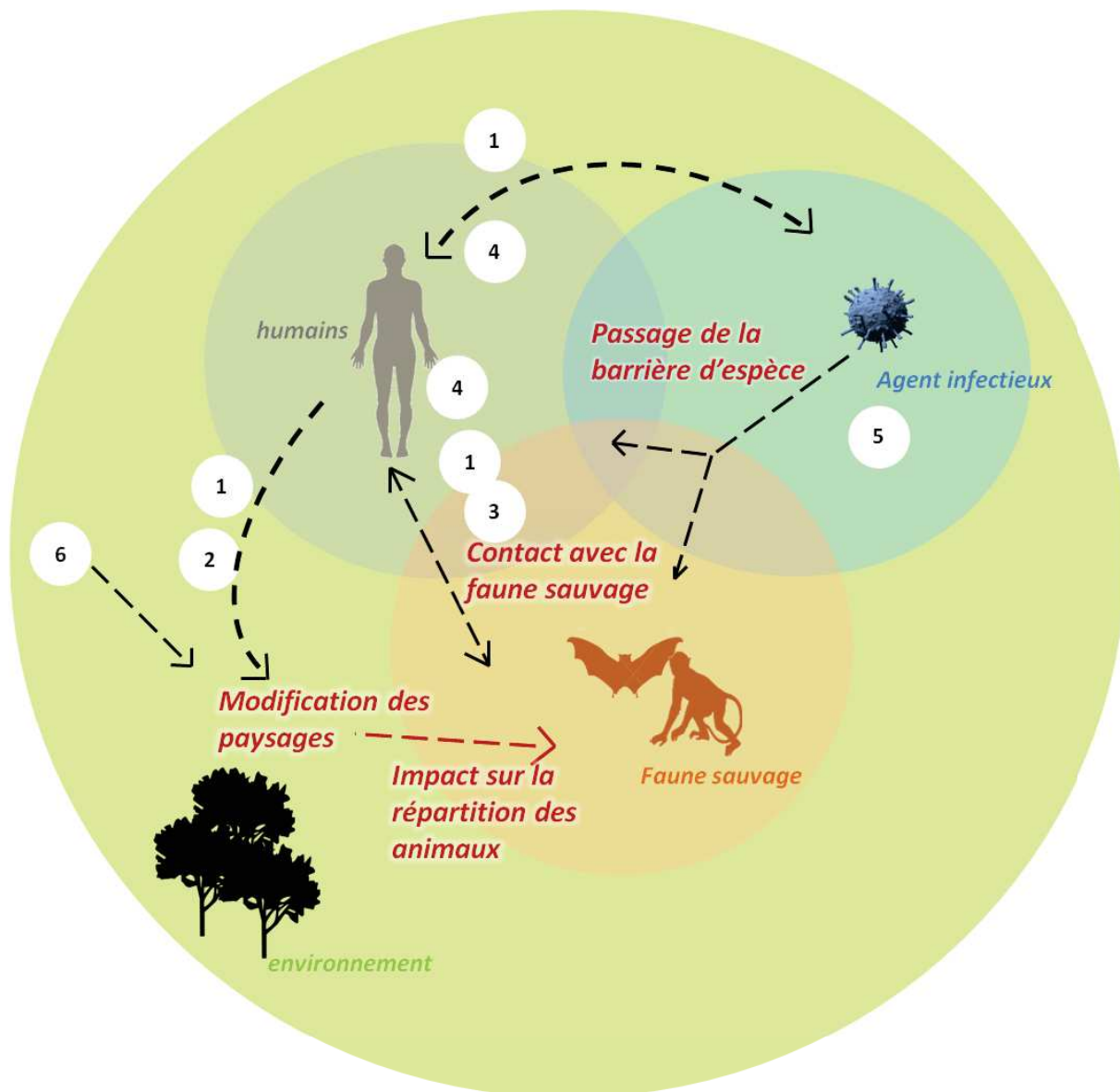
Tableau 1 : Résumé des principaux facteurs impliqués dans l'émergence des maladies infectieuses zoonotiques, et quelques exemples de maladies associées

Facteurs impliqués dans l'émergence des maladies infectieuses zoonotiques	Références de revue	Exemples de cas
(1) Comportement humain et démographie	(Taylor <i>et al.</i> , 2001; Wilson, 1995)	Le virus du SIDA transmis par voie sexuelle (Hahn <i>et al.</i> , 2000) Le virus de la dengue dans les zones urbanisées (Sim et Hibberd, 2016; Telle <i>et al.</i> , 2016)
(2) Développement économique et utilisation de nouveaux territoires par l'Homme	(Jones <i>et al.</i> , 2013)	La déforestation et le développement de l'agriculture intensive vs. l'émergence du virus Nipah (Looi et Chua 2007; Chua, Chua, et Wang 2002)
(3) Commerce des animaux, de l'échelle locale à internationale	(Chomel <i>et al.</i> , 2007; Swift <i>et al.</i> , 2007)	La diffusion du coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) par le commerce de civettes (Wang et Eaton, 2007)
(4) Mesures de santé publique	(Gayer <i>et al.</i> , 2007; Laaser et Brand, 2014)	Le système de prise en charge lacunaire des patients dans l'épidémie du virus à Ebola en Afrique de l'Ouest (Bausch et Rojek, 2016)
(5) Adaptation de l'agent pathogène à son hôte	(Holmes et Drummond, 2007)	L'évolution de virus influenza animaux (aviaires, porcines) vers des souches pathogènes pour l'Homme (Cunha, 2004; Shoham, 2006)
(6) Changements climatiques	(Khasnis et Nettleman, 2005; Patz <i>et al.</i> , 1996)	L'impact du phénomène El Niño sur l'émergence du virus Nipah (Chua, Chua, et Wang 2002) La modification de l'aire de répartition d' <i>Aedes albopictus</i> impacte l'épidémiologie de la dengue (Lambrechts <i>et al.</i> , 2010)

Morens *et al.* (2004) mettent en évidence des facteurs additionnels qui, dans une moindre mesure ou de manière plus ponctuelle, peuvent agir sur l'émergence des maladies infectieuses, à savoir la susceptibilité de la population humaine à une infection, la pauvreté et

les inégalités sociales, les épisodes de guerre ou de famine, et enfin, le bioterrorisme (Morens *et al.*, 2004).

Daszak *et al.* (2000) suggèrent que l'émergence de maladies à partir d'animaux sauvages est d'abord un processus écologique. Ils décrivent un continuum hôtes-agents émergents finement équilibré entre faune sauvage, domestique, environnement et populations humaines. Tout changement dans l'environnement ou dans le comportement de l'hôte (facteurs 1, 2, 3 et 4) fournit aux agents infectieux de nouvelles niches écologiques favorables à leur émergence et qui leur permettent d'atteindre de nouveaux hôtes animaux et humains (Morens *et al.* 2004). La capacité de l'agent pathogène à franchir la barrière d'espèce, à s'adapter à l'environnement de l'hôte et à s'y multiplier est cruciale dans le processus d'émergence (facteur 5). Chez les virus, et en particulier chez les virus à ARN, cette capacité est particulièrement développée, grâce aux taux de mutations, recombinaisons ou réarrangements du génome bien plus élevés que chez les organismes cellulaires (Domingo, 1994; Moya *et al.*, 2004; Holmes et Drummond, 2007; Holmes, 2009). Leur adaptation à l'Homme et leur virulence reposent néanmoins sur des dynamiques supplémentaires ayant un lien direct avec le système hôte-pathogène.



- (1) Comportement humain et démographie
- (2) Développement économique et utilisation des territoires
- (3) Commerce des animaux
- (4) Mesures de santé publique
- (5) Adaptation de l'agent pathogène à son hôte
- (6) Changements climatiques

A. Lacroix ©

Figure 1 : Les différents facteurs de l'émergence de maladies zoonotiques. Les facteurs principaux sont numérotés de 1 à 6, en noir. Les conséquences sont présentées en rouge. Les quatre entités représentées sont : l'environnement (vert), la faune sauvage (orange), les humains (gris) et l'agent pathogène (bleu). Les activités humaines telles que l'intensification des activités agricoles, la déforestation et l'urbanisation augmentent (1, 2, 3), l'interface entre l'Homme et les populations animales sauvages ou domestiques constitue un "pont épidémiologique" qui offre de nombreuses opportunités de passage de barrière d'espèce aux agents pathogènes émergents. Sa survie dépend de sa capacité à s'adapter à l'environnement de son hôte (5).

I. B. Le concept de zoonose : l'émergence d'un agent pathogène animal dans la population humaine

Le processus de transformation d'un agent pathogène uniquement animal en un agent pathogène humain peut être décrit selon 5 stades, d'après Wolfe (figure 2) (Wolfe *et al.*, 2007). Le stade initial définit un pathogène exclusivement animal.

Le stade 2 définit la transmission d'un agent pathogène d'origine animale, à l'Homme par le biais d'un contact direct ou indirect. L'agent pathogène franchit la barrière d'espèce et infecte l'individu qui développe des symptômes, sans pour autant contaminer d'autres hommes. A titre d'exemple, la rage (lyssavirus) est transmise par les canidés et chiroptères et aboutit à la mort de l'individu humain infecté, sans que ce dernier n'ait infecté d'autres individus.

La transmission effective de l'agent pathogène aux humains est relativement rare. Lorsqu'elle se produit, la transmission inter-humaine entretient l'infection pendant une certaine période (stade 3) ou de façon permanente (stade 4) (Bengis *et al.*, 2004).

Le passage du stade 2 aux stades 3 et 4 suppose que l'agent pathogène a la capacité de franchir la barrière d'espèce, puis de continuer son cycle viral chez l'hôte humain, avec une contamination inter-humaine limitée si le cycle n'est pas entretenu par des contaminations régulières provenant du réservoir animal (stade 3). C'est le cas du coronavirus MERS, qui est responsable du syndrome respiratoire du Moyen-Orient et transmis par les camélidés (Zumla *et al.*, 2015). Des transmissions inter-humaines entre patients et personnel de soin sont rapportées mais restent cependant limitées (Assiri *et al.*, 2013; Balkhy *et al.*, 2016).

Le passage au stade 4 suppose que l'agent pathogène puisse continuer son cycle viral chez l'Homme qui est capable de le sécréter à nouveau, et de contaminer d'autres individus

humains. C'est le cas du virus Ebola, qui est responsable de flambées de fièvre hémorragique chez l'Homme et de l'apparition de foyers ponctuels détectés depuis les années 70, mais aussi de l'importante épidémie apparue en Afrique de l'Ouest de 2013 à 2015 (Groseth *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2009; Bausch et Rojek, 2016).

Le stade ultime de l'émergence d'une zoonose se manifeste lorsque l'agent d'origine animale a accumulé suffisamment de modifications au fil des générations dans l'hôte humain pour présenter un phénotype exclusivement humain. C'est le cas du virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1), qui provient du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) touchant exclusivement les primates (Etienne et Peeters, 2010). C'est également le cas du coronavirus responsable du SRAS, transmis à l'Homme par la civette, en Chine, puis devenu transmissible d'Homme à Homme par voie aérienne sans que le contact avec l'hôte initial ne soit nécessaire (Xu *et al.*, 2004). Dans ces deux exemples de pandémie, le contact (potentielles morsures, consommation de viande) avec la faune sauvage (respectivement primates et civettes) a engendré une transmission du virus qui a évolué vers un virus strictement spécifique à l'Homme (Wain *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2004).

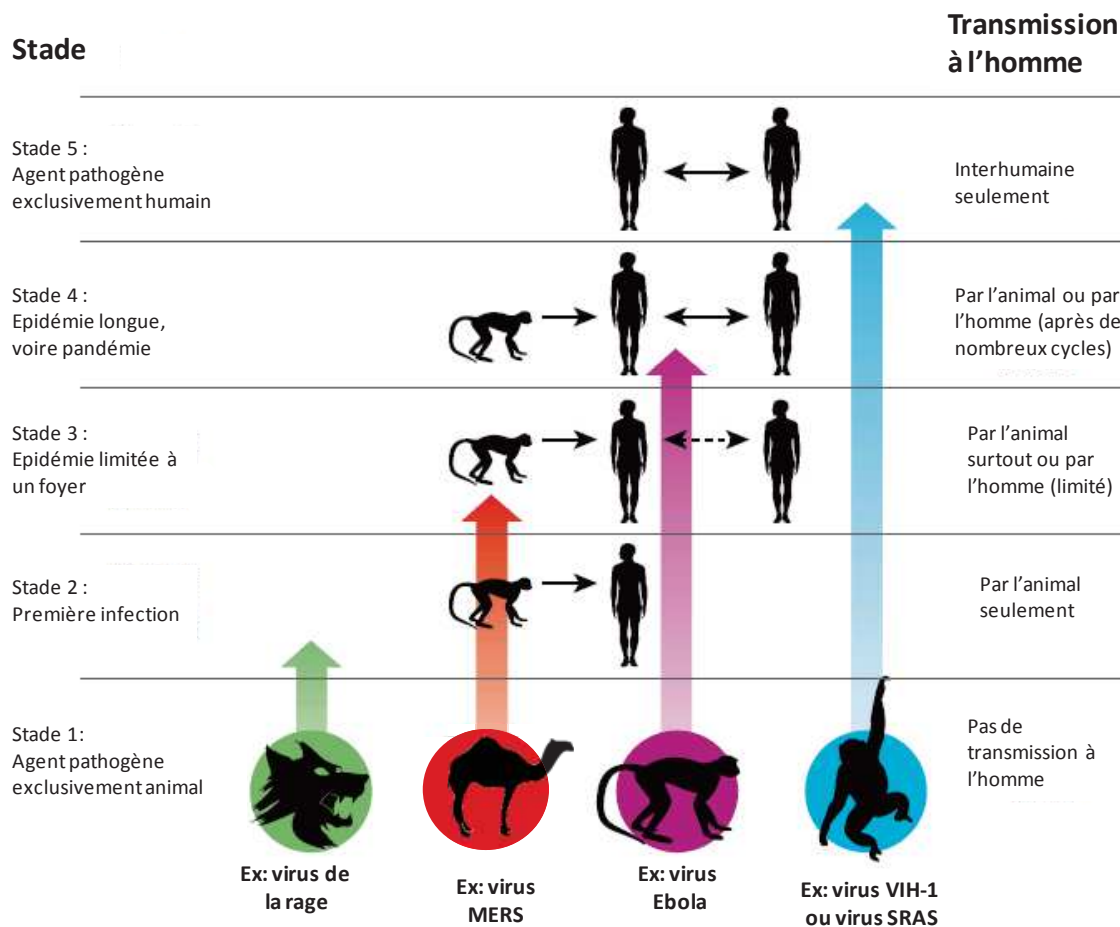


Figure 2 : Le processus d'émergence d'une zoonose : les 5 étapes de la transformation d'un agent pathogène uniquement animal en un agent pathogène exclusivement humain (modifié d'après Wolfe *et al.* 2007).

I. C. L'Asie du Sud-Est, un point chaud pour l'émergence des zoonoses

En modélisant les différents paramètres impliqués dans l'émergence de zoonoses (facteurs climatiques, anthropologiques, socio-économiques, bio-écologiques), Jones *et al.* (2008) ont cartographié les régions du globe où le risque d'émergence est très fort (figure 2). L'Asie du Sud-Est (ASE) regroupe de nombreux facteurs prédisposant à l'émergence de nouvelles maladies et figure clairement parmi les zones à haut risque, dites de "point chaud".

En ASE, comme pour la plupart des régions tropicales et sub-tropicales, la biodiversité est supérieure à d'autres régions du globe. L'ASE regroupe 4 des 25 points chauds de biodiversité (Myers *et al.*, 2000). De plus, c'est dans cette région que la croissance économique et démographique est la plus forte (Bloom et Williamson, 1998). Cette croissance s'est accompagnée d'une intensification des activités agricoles et industrielles et d'une modification forte des paysages. Dans son étude, Achard (2000) estime qu'à la fin du 20ème siècle, le taux de déforestation en ASE était le plus élevé de toutes les régions tropicales, avec une perte annuelle de 0.91% de la couverture forestière, soit 2.5 millions d'ha de forêt perdus par an (Achard *et al.*, 2002). On estime qu'en 2100, la région aura perdu les trois quarts de sa couverture forestière et 42% de sa biodiversité (Sala *et al.*, 2000; Sodhi *et al.*, 2004). L'exploitation de cette biodiversité pour le commerce (par exemple, l'exploitation de bois précieux) ou la consommation personnelle (par exemple, la consommation de viande de brousse) y est très répandue (Sodhi *et al.*, 2004). Ces facteurs favorisent les contacts entre les populations humaines et la faune sauvage. Par conséquent, le risque de transmission de ces agents, ainsi que celui de voir de nouvelles maladies émerger augmente. Enfin, l'intensification des échanges internationaux entre l'ASE et le reste du monde, accroît le risque d'une rapide propagation de maladies émergentes, avec des conséquences socio-économiques et sanitaires notables.

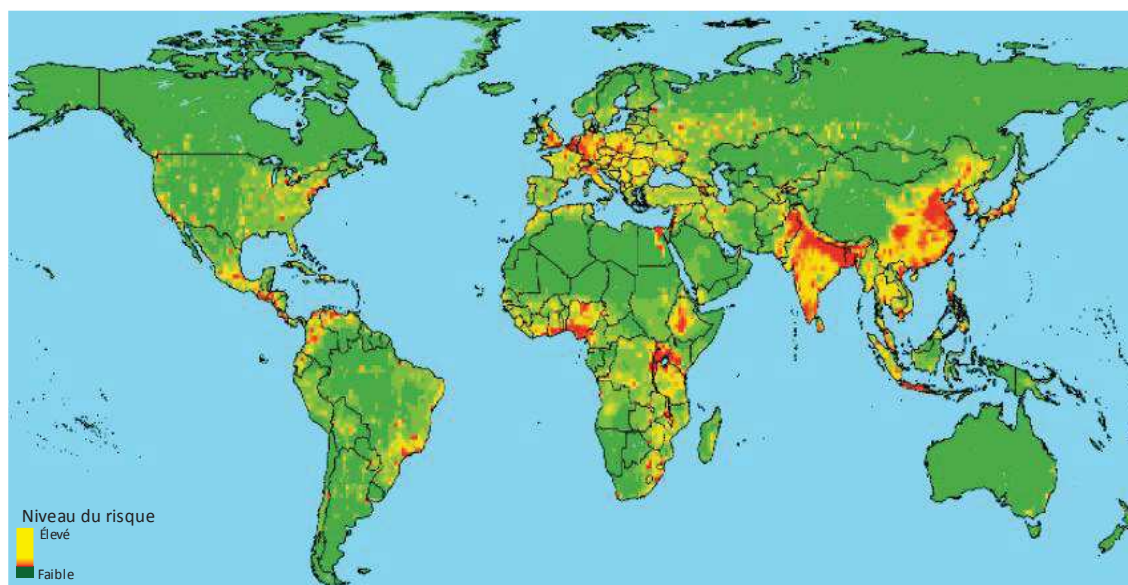


Figure 3 : Carte de la distribution des risques d'émergence de maladies infectieuses zoonotiques dans le monde. (d'après Jones *et al.* 2008). A partir d'une analyse des différents facteurs socio-économiques, environnementaux et écologiques impliqués dans les événements d'émergence.

Enfin, si Jones démontre que les zones tropicales sont plus exposées au risque de voir apparaître des foyers d'émergence de maladies infectieuses que les autres régions, l'auteur note également que les deux tiers des événements d'émergence qu'a connus le monde entre 1940 et 2004 ont été rapportés dans des pays développés (USA, Japon, Australie, Europe) (Jones *et al.*, 2008). La détection des maladies émergentes semble davantage liée au niveau de développement économique d'une région qu'au niveau de risque réel d'émergence. Ces données alarmantes reflètent la nécessité de prioriser les recherches et les efforts de santé publique dans les zones à risque, et en particulier en ASE.

I. D. Les zoonoses virales émergentes et leur impact en santé publique

Cette thèse porte sur les zoonoses émergentes d'origine virale, qui ont eu un fort impact en santé publique depuis ces dernières décennies (Wang et Crameri, 2014). Les pandémies du SIDA, du SRAS, de grippe ou encore la récente épidémie de fièvre

hémorragique à Ebola en Afrique de l'Ouest ont marqué les esprits ces 40 dernières années. Nous ne développerons pas toutes les zoonoses existantes dans cette partie, mais nous nous focaliserons sur des exemples de zoonoses prenant leur origine chez les chiroptères, et en relation avec le continent asiatique.

Trois virus émergents ont eu un impact majeur en santé publique et dans la prise de conscience de l'importance des chiroptères en tant que réservoirs de virus émergents. Il s'agit des hénipavirus (virus Hendra et Nipah), et du coronavirus responsable du SRAS. Nous évoquerons la chronologie, les conséquences sanitaires et économiques associées à ces épidémies, avant de soulever les problématiques engendrées par l'émergence de ces zoonoses.

I. D.1. Les hénipavirus

L'émergence des virus Hendra (HeV) et Nipah (NiV) a conduit à la création d'un nouveau genre *Henipavirus* de la famille des *Paramyxoviridae*, capables de provoquer une maladie mortelle chez l'Homme (Wild, 2009).

I. D.1.a. L'épidémie du virus Hendra (1994)

Un premier foyer de pneumonie équine mortelle a été mis en évidence à Brisbane, Australie en 1994, associé à des syndromes respiratoires et encéphaliques chez les humains en contact étroit avec des chevaux (Murray *et al.*, 1995; Selvey *et al.*, 1995). Un nouveau paramyxovirus du genre *Morbivillus* a été identifié comme l'agent pathogène responsable de cette zoonose mortelle. Ce virus nommé Hendra (HeV) peut provoquer chez l'Homme un état grippal bénin qui peut s'aggraver en syndrome respiratoire grave et neurologique, mortel dans 57% des cas (WHO 2009). D'autres cas ont été documentés par la suite dans le Queensland,

en 1995, 1999, 2004 et 2006, et tous étaient associés à une exposition à des chevaux infectés, sans aucune transmission interhumaine rapportée (Wild, 2009). Les études sérologiques et moléculaires de la faune alentour ont permis de confirmer la circulation saisonnière du virus Hendra chez deux espèces de roussette (chiroptères frugivores, *Pteropus poliocephalus* et *P. alecto*), définies comme le réservoir du virus (Young *et al.* 1996; Halpin *et al.* 2000). Les foyers correspondent à l'aire de répartition de ces chiroptères, infectés par ce virus de manière asymptomatique. La contamination des chevaux par le virus, se fait par contact avec l'urine des chiroptères infecté. Les chevaux contaminés joueraient alors le rôle d'hôtes intermédiaires dans la transmission du virus à l'Homme.

1. D.1. b. L'épidémie du virus Nipah

En 1998, dans la région de Nipah en Malaisie, une flambée d'encéphalite mortelle a touché les ouvriers du secteur porcin. Elle était due à un virus proche du virus Hendra, baptisé virus Nipah (NiV), transmis par voie aérienne par l'intermédiaire des porcs (Chua *et al.*, 1999). L'infection chez l'Homme peut provoquer des symptômes grippaux bénins, ainsi que des problèmes respiratoires aigus, accompagnés d'encéphalites qui peuvent évoluer en 48 heures vers le coma, puis la mort (Escaffre *et al.*, 2013).

Dans les mois suivants, d'autres foyers ont été déclarés en Malaisie et à Singapour, au sein des élevages porcins et des abattoirs (Paton *et al.*, 1999). Au total, 265 cas humains, dont 105 mortels, ont été répertoriés. L'abattage de 1,2 million de porcs malaisiens a permis de stopper l'épidémie, engendrant l'effondrement de l'industrie porcine et des bouleversements économiques sans précédent dans le pays (Chua, 2003; Ksiazek *et al.*, 2011). L'impact financier a été estimé à près d'un milliard de dollars (US\$) (Looi et Chua, 2007; Chiu Wan *et al.*, 2009).

Avec l'expérience des virus Hendra et Menangle (un paramyxovirus détecté en 1997, affectant les élevages porcins en Australie et dont la circulation chez les chiroptères et les humains a été mise en évidence), les épidémiologistes ont rapidement concentré leurs investigations sur les chiroptères qui évoluaient près des structures d'élevage (Enserink, 2000). Le virus Nipah (NiV) a été isolé chez des roussettes (*Pteropus poliocephalus* et *P. alecto*), et sa circulation a été mise en évidence chez d'autres espèces chiroptères frugivores de Malaisie (*Eonycteris spelaea*, *Cynopterus brachyotis*). Les scientifiques ont ainsi confirmé le rôle de réservoir que joue ce chiroptère pour ce virus zoonotique, pour lequel les porcs jouent un rôle d'hôtes intermédiaires et amplificateurs (Halpin *et al.* 2000; Yob *et al.* 2001; Kaw Bing Chua *et al.* 2002). Depuis, la circulation du virus Nipah a été mise en évidence au Cambodge, en Inde, en Thaïlande et en Indonésie, chez d'autres roussettes du même genre (*Pteropus hypomelanus*, *P. vampyrus*, *P. gigantecus* et *P. lylei*) (Chua *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2002; Reynes *et al.*, 2005; Wacharapluesadee *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2012; Sendow *et al.*, 2013).

D'autres foyers ont été détectés au Bangladesh (Hsu *et al.* 2004; Luby *et al.* 2006; Hughes *et al.* 2009). La transmission du virus s'est opérée par le biais d'animaux domestiques (caprins, bovins et porcs), mais aussi directement à l'Homme par la consommation de jus de palme contaminé par les chiroptères. Des transmissions interhumaines ont également été rapportées durant les pics d'épidémies (Gurley *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2009). Ces "nouveauautés" dans l'épidémiologie du virus démontrent la capacité de diffusion du virus Nipah. De fait, si les circonstances en Malaisie laissaient à croire que le virus Nipah était au "stade 2" sur l'échelle de Wolfe (2009) présentée précédemment, l'épidémiologie du NiV au Bangladesh montre qu'il semble être capable de passer au "stade 3".

I. D.2. La pandémie du SRAS

En novembre 2002, des cas de pneumopathie aigüe atypique ont été rapportés dans le Sud de la Chine (Rosling et Rosling 2003). Le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) a été signalé aux autorités sanitaires internationales pour la première fois en février 2003, à Hong Kong (Tsang *et al.* 2003). Cette pathologie, qui s'est ensuite répandue très rapidement auprès d'individus ayant fréquenté le même hôtel à Hong Kong, ou le même avion, a alerté les autorités sanitaires (WHO 2003). En quelques mois, 8 098 cas (dont 774 morts) ont été signalés dans 33 pays (Wang *et al.*, 2006). La fin de cette épidémie sans précédent a officiellement été déclarée le 5 juillet 2003 par l'OMS. Certains parlent de pandémie. Les chercheurs ont identifié un coronavirus (CoV) transmis par voie aérienne et très contagieux, comme étant l'agent responsable de cette pandémie (Peiris *et al.*, 2003).

Les études épidémiologiques ont rapidement confirmé l'origine animale du virus (Guan *et al.*, 2003). La civette palmiste (*Paguma larvata*), régulièrement consommée en Chine, a été identifiée comme l'hôte initial du coronavirus SRAS à partir duquel l'épidémie s'est développée. Cet animal sauvage est chassé, ou élevé, puis vendu sur les marchés vivants, où les premières transmissions du virus à l'Homme auraient eu lieu (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003; Wang et Eaton, 2007). Après de nombreuses investigations, le virus a aussi été détecté chez une chauve-souris insectivore (*Rhinolophus* sp.), identifiée comme étant le réservoir principal du virus du SRAS (Lau *et al.*, 2005).

Cette pandémie a engendré de nombreuses pertes économiques. Le tourisme a chuté en Chine et les fonds d'investissements étrangers ont baissé de 62% à Hong Kong en mai 2003 (Lee et McKibbin, 2004). A l'échelle internationale, Saywell estime la perte économique associée à cette pandémie, à 11 milliards de dollars (US\$) (Saywell *et al.*, 2003).

I. D.3. La prise de conscience de l'impact des zoonoses en santé publique

Bien que présentant un taux de létalité assez faible (10%), le virus du SRAS a frappé par la rapidité et l'ampleur de la contamination à travers le monde. La pandémie du SRAS a été stoppée en quelques mois grâce à un réseau d'alerte international efficace et au déploiement de mesures sanitaires drastiques à l'échelle internationale (mise en quarantaine, contrôles sanitaires aux frontières, découverte rapide de l'agent causal, etc.). Cependant, le SRAS était déjà présent dans la province du Guangdong vers la fin 2002. Son importance semble alors avoir été sous-estimée par les autorités sanitaires chinoises, avant que l'épidémie ne prenne une dimension internationale quelques mois plus tard. Cette pandémie a permis une prise de conscience considérable de la part des autorités sanitaires de la notion de santé publique globale (Fontanet, 2007; Glasser *et al.*, 2011).

En 2005, l'OMS a mis en place le Règlement Sanitaire International (RSI), signé par les 194 pays membres, et qui a pour but de prévenir et répondre aux événements de santé publique de portée internationale. Les efforts de santé publique se focalisent sur le renforcement des capacités d'alerte et de détection précoce d'un agent pathogène émergent (Merianos et Peiris, 2005). Ceci peut notamment se faire à travers le réseau mondial d'alerte et d'action en cas d'épidémie (réseau GOARN, pour "Global Outbreak Alert and Response Network", crée en 2000) et par le biais de la standardisation des mesures sanitaires à l'échelle des pays (WHO, 2015).

L'épidémie de grippe porcine de 2009 (virus influenza H1N1), ou encore la récente épidémie du virus Ebola (2013-2015) nous rappellent la difficulté de maîtriser les zoonoses après leur émergence ou réémergence et la nécessité d'appliquer les mesures du RSI de 2005. La mise en application de ces mesures reste encore difficile : en 2012, à peine 20% des pays signataires du RSI avaient respecté leurs engagements (Braden *et al.*, 2013).

Au travers de ces exemples, nous retrouvons les facteurs associés à l'émergence des zoonoses décrits en première partie de ce travail. Ils sont présentés dans le tableau 2 ci-après. La figure 4 détaille ces facteurs dans le cadre de l'émergence du NiV. Les cas du SRAS et du Nipah illustrent à quel point il est nécessaire de comprendre l'écologie du réservoir biologique du virus, mais aussi le commerce et le contexte social et culturel de la consommation de la faune (sauvage et domestique).

Tableau 2 : Les facteurs impliqués dans l'émergence du SRAS et de l'encéphalite à virus Nipah.

Facteurs impliqués dans l'émergence des maladies infectieuses zoonotiques	SRAS	virus Nipah
Stade selon Wolfe	Stade 4	Stade 2 à 3
(1) Comportement humain et démographie	Diffusion très rapide du virus après le patient "zéro" Chasse et consommation de civette	Augmentation de la population, des besoins alimentaires (dont la consommation de porc) Consommation de jus de palme frais, contaminé par le virus (Islam <i>et al.</i> , 2016)
(2) Développement économique et utilisation des territoires	Fermes d'élevage pour ces animaux originellement sauvages	Intensification de la production porcine en Malaisie Multiplication d'activités : construction d'exploitations porcines à côté de vergers
(3) Commerce des animaux, de l'échelle locale à internationale	Commerce de civettes, marchés d'animaux vivants	Importation de porcs infectés à Singapour, responsable de la diffusion de l'encéphalite sur ce territoire
(4) Mesures de santé publique	Difficultés à identifier le virus responsable et l'origine exacte de la pandémie, à stopper les flux de personnes pour enrayer la pandémie	
(5) Adaptation de l'agent pathogène à son hôte	Les spicules du SRAS CoV présentent une grande affinité pour certains récepteurs cellulaires humains (ACE2)	Des cas de transmissions interhumaines ont été documentés
(6) Changements climatiques	(Khasnis et Nettleman, 2005; Patz <i>et al.</i> , 1996)	Impact du phénomène El Niño sur l'émergence du virus Nipah (Chua, Chua, et Wang 2002)

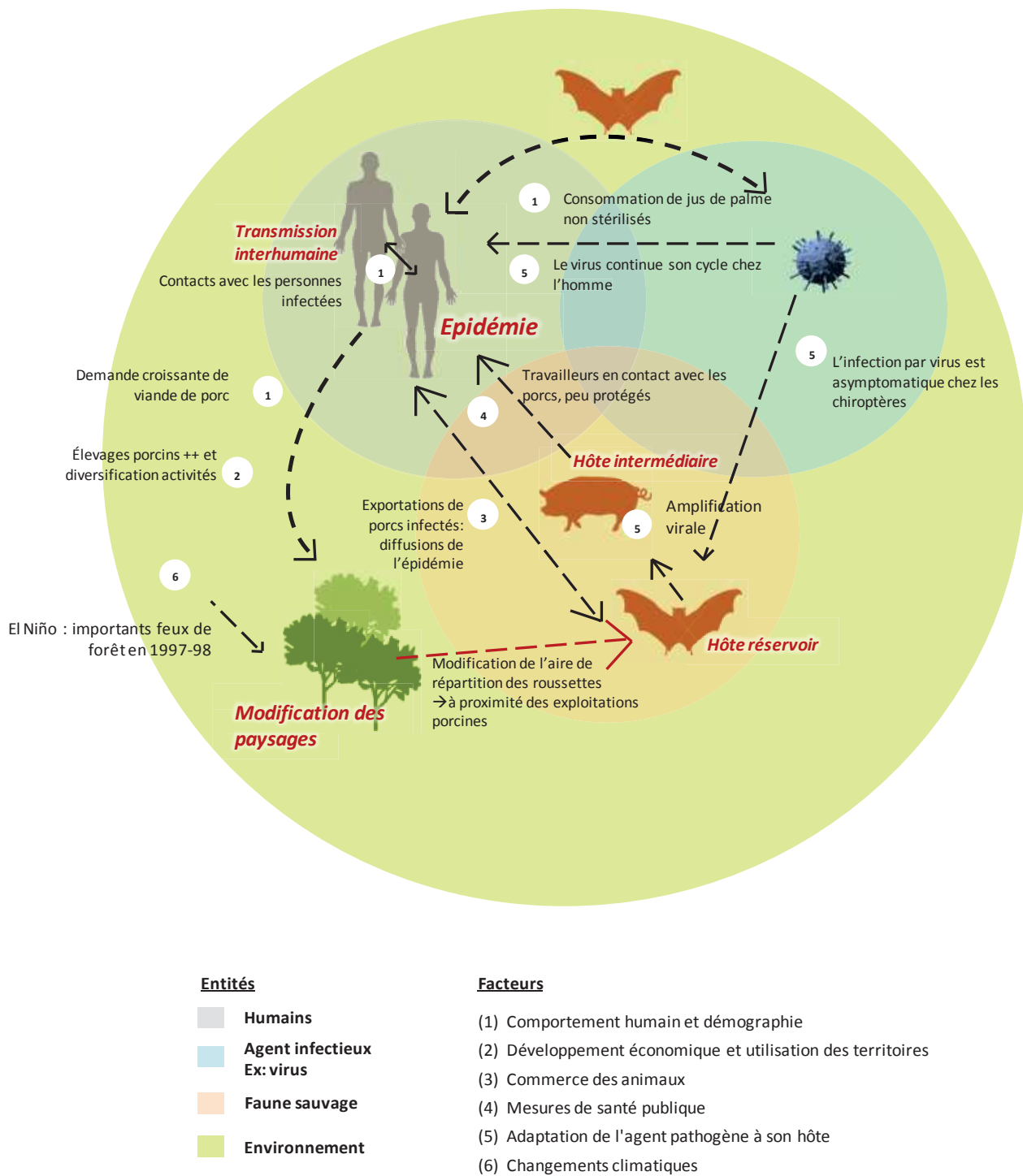


Figure 4 : Les facteurs de l'émergence du virus Nipah.

II. Les chiroptères, un réservoir de virus zoonotiques

II. A. Introduction générale sur les chiroptères

Vingt-et-un pour cent des mammifères sont des chiroptères (Wong *et al.*, 2007). Représentés par 1240 espèces, ils constituent le deuxième ordre de mammifères le plus abondant sur terre après les rongeurs (Wilson et Reeder, 2005). Les chiroptères sont très diversifiés et dispersés géographiquement (tableau 3). Ils sont présents dans tous les types d'habitats à l'exception des régions polaires et de quelques îles. Les chiroptères sont mal connus, perçus comme étranges et inquiétants. Ils ont pourtant un rôle écologique indéniable dans le fonctionnement de la biosphère à travers la régulation des populations d'insectes, la pollinisation des plantes à fleurs ou encore la dissémination des graines.

Les chiroptères sont également impliqués dans la transmission de zoonoses virales. Ils ont été identifiés comme le réservoir d'une soixantaine de virus, dont une grande partie est pathogène chez l'Homme. C'est le cas des *Rhabdoviridae* (Lyssavirus), des *Paramixoviridae* comme les virus Hendra, Nipah, des *Filoviridae* (virus Marburg et Ebola) ou encore des *Coronaviridae*. Nous verrons que certaines caractéristiques associées à ces chiroptères expliquent et favorisent la circulation de ces zoonoses virales.

II. A.1. La vision des chiroptères à travers les cultures

Les chiroptères sont des animaux généralement mal aimés. Leur mode de vie, nocturne et mystérieux, a longtemps été méconnu et sujet à de nombreuses idées reçues. Ils suscitent des craintes fondées sur des croyances et légendes. Ils ont, par exemple, la réputation d'être

hématophages alors que seulement trois espèces d'Amérique du Sud le sont vraiment (*Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata*, *Diaemus youngi*) (Barquez *et al.*, 2015, 2008; Sampaio *et al.*, 2008).

Déjà dans la Rome antique, Davis Basilis décrivait les chiroptères comme des êtres "par nature, apparentés au diable". Dans la religion chrétienne, ils sont également associés au démon. Cette vision négative est depuis largement relayée dans la culture occidentale, à travers de nombreuses illustrations et œuvres cinématographiques (figure 5).

Toutefois, par le passé, les Mayas et les Aztèques les considéraient comme des êtres protecteurs. Le culte au dieu "chauve-souris", Camatzotz, serait né avec les zapotèques (civilisation amérindienne pré-colombienne, environ 1500 av. J.-C.) dans la région d'Oaxaca. Ce dieu, qui incarne la mort, a continué à être vénéré par les Mayas en Amérique centrale, et associé à des sacrifices de sang et des rituels cannibales. En Chine, les chiroptères incarnent depuis la dynastie Qing (1644-1912), la chance, la longévité, la sérénité de l'esprit et le bonheur. Dans certains pays, ils sont sacrés (Australie, Bosnie, Afrique de l'Ouest, îles Tsonga).



Figure 5 : Exemples de la vision culturelle des chiroptères par l'Homme. (A) Francisco Goya (1923) illustre dans son œuvre "Les Résultats", la folie de la guerre symbolisée par la chauve-souris assoiffée de sang (Goya, 1903); (B) sculpture aztèque de Camatzotz, le Dieu de la mort (crédit photo : R.Colombo); (C) célèbres exemples littéraires qui véhiculent l'image de terreur des chiroptères: "The moloch manœuvres" de Jim Mc Person (crédit photo : Phantacea Publications), "Dracula" de Bram Stoker (1897) (crédit photo : Sterling publishing) .

Leur capacité à voler a suscité la curiosité de nombreux scientifiques et physiciens. Léonard de Vinci s'en est inspiré pour ses prototypes de machines volantes. Clément Ader a construit ses premiers prototypes d'aéroplanes, inspirés directement de l'anatomie des chiroptères (Dollfus, Beaubois et Rougeron, 1965) (figure 6).



Figure 6 : L'avion III (l'Aiglon) créé par Clément Ader. L'engin possède une envergure de 16 mètres, il est testé au camp militaire de Satory en 1897, où il décolle péniblement du sol (crédit photo: Musée des arts et métiers).

II. A.2. Classification des chiroptères

La classification traditionnelle des chiroptères se base sur les données morphologiques et paléontologiques et définit deux sous-ordres : les *Megachiroptera* et les *Microchiroptera* (Dobson, 1875). Les mégachiroptères, communément appelés « chauves-souris frugivores de l'ancien monde », sont incapables d'écholocation. Ils sont constitués de 42 genres et 195 espèces organisées en une seule famille : les *Pteropodidae*. Les microchiroptères sont doués d'écholocation et sont généralement insectivores et nocturnes. Il en existe 1079 espèces ubiquitaires réparties en 20 familles (Moratelli et Calisher 2015; Tsang *et al.* 2016), dont deux récemment définies (Miller-Butterworth *et al.* 2007; Lack *et al.* 2010). Une forte diversité d'espèces est observée dans les tropiques (Wilson et Reeder 2005). Certains peuvent être frugivores, carnivores, omnivores voire hématoophages (tableau 3). De manière générale les mégachiroptères sont plus grands que les microchiroptères. Certaines espèces peuvent atteindre 1,50 m d'envergure (*Pteropus* sp.), alors que les plus petites pipistrelles ne mesurent que quelques centimètres (*Pipistrellus* sp.) (Allen, 2004).

La classification des chiroptères en groupes monophylétiques a été revisitée avec l'arrivée de la phylogénie moléculaire et l'étude de l'évolution de l'écholocation. Sur la base des données moléculaires, Koopman (1984) a établi le sous-ordre des *Yangochiroptera* qui inclut 14 familles de microchiroptères (figure 7). Springer (2001) a validé l'hypothèse que le groupe des *Microchiroptera* n'est pas monophylétique et définit le deuxième sous-ordre des *Yinpterochiroptera* qui inclut les mégachiroptères et cinq familles de microchiroptères (*Craseonycteridae*, *Hipposideridae*, *Megadermatidae*, *Rhinopomatidae* et *Rhinolophidae*) (Springer, 2001; Teeling, 2005; Springer, 2013).

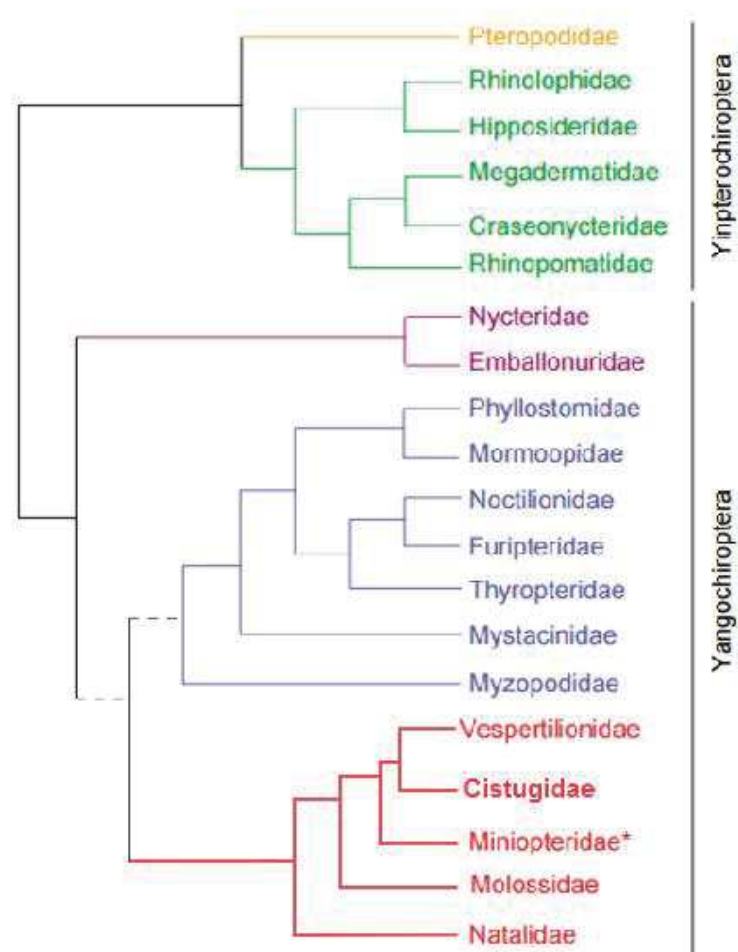


Figure 7 : Arbre phylogénétique simplifié des familles de chiroptères (modifié d'après Jones et Teeling 2006; Moratelli et Calisher 2015; Tsang *et al.* 2016). Les sous-ordres sont précisés en noir. Les quatre super-familles de microchiroptères sont les *Rhinolophidea* (vert), *Emballuronidea* (violet), *Noctilionidea* (bleu) et *Vespertilionidea* (rouge). Les *Pteropodidae* constituent la seule famille de mégachiroptères.

Tableau 3 : Vue générale de la diversité des chiroptères, par sous-ordre et par famille. Le nombre (nb) de genres et d'espèces, le régime alimentaire et la distribution géographique de chaque famille sont précisés (d'après Wilson et Reeder 2005; Wong *et al.* 2007, Tsang *et al.* 2016). Les sous-ordres sont définis sur la base des analyses phylogénétiques (première colonne), ou plus communément sur la morphologie des chiroptères (deuxième colonne).
 (*) familles de chiroptères présentes en Asie du Sud-Est. En gris: familles de chiroptères qui seront évoquées dans cette thèse.

Sous-ordre (phylogénie)	Sous-ordre (morphologie)	Famille	Nb de genres (nb d'espèces)	Nom commun	Régime alimentaire	Distribution géographique
	<i>Megachiroptera</i>	<i>Pteropodidae</i> *	42 (195)	Roussette Renard volant ("flying fox")	Fruits, nectars, pollen, insectes	Asie tropicale, Australie, Afrique
<i>Yinpterochiroptera</i>		<i>Rhinolophidae</i> *	1 (88)	Rhinolophe ("Horsehoes bat")	Insectes	Ancien monde, zones tempérées et tropicales
		<i>Hipposideridae</i> *	9 (90)	Chauve-souris à feuille nasale ("Old World leaf-nosed bat")	Insectes	Ancien monde, zones tempérées et tropicales
		<i>Megadermatidae</i> *	4 (5)	Faux-vampire ("false vampire")	Arthropodes, petits vertébrés	Asie tropicale, Autralie, Afrique
		<i>Craseonycteridae</i> *	1 (1)	Chauve-souris bourdon ("Bumblebee bat")	Insectes	Thaïlande, Myanmar
		<i>Rhinopomatidae</i>	1 (5)	Rhinopome ("Mouse-tailed bat")	Insectes	Afrique du Nord, Inde
<i>Yangochiroptera</i>	<i>Microchiroptera</i>	<i>Phyllostomidae</i>	55 (197)	Chauve-souris à feuille nasale ("New World Leaf-nosed Bat")	Fruits, nectars, pollen, insectes, petits vertébrés, sang (3 espèces)	Nouveau monde, zones tropicales
		<i>Emballonuridae</i> *	13 (54)	Chauve-souris à queue gainée ("sheath-tailed bat")	Insectes	Monde, régions tropicales
		<i>Furipteridae</i>	2 (2)	Chauve-souris fuligineuse ("Smoky bat")	Insectes	Amérique du Nord et du Sud
		<i>Molossidae</i> *	16 (110)	Chauve-souris sans queue (" Free-tailed bat")	Insectes	Nouveau monde, zones tropicales et sud-tropicales
		<i>Mormoopidae</i>	2 (10)	Chauve-souris à moustache ("Mustached-bat")	Insectes	Nouveau monde, zones tropicales
		<i>Mystacinidae</i>	1 (2)	Chauve-souris à queue courte ("New-Zeland short-tailed bat")	Fruits, nectars, pollen, insectes, petits vertébrés	Nouvelle-Zélande
		<i>Myzopodidae</i>	1 (2)	Chauve-souris à pieds ventousés ("sucker-footed")	Insectes	Madagascar
		<i>Natalidae</i>	3 (9)	Chauve-souris à oreilles en entonnoir ("funnel-eared bat")	Insectes	Nouveau monde, zones tropicales
		<i>Noctilionidae</i>	1 (2)	Noctilion ("bull-dog bats", "fisherman bat")	Arthropodes, poissons	Nouveau monde, zones tropicales
		<i>Nycteridae</i>	1 (16)	Nyctère (" slit-faced bat ")	Arthropodes	Afrique, Asie du Sud-Est
		<i>Thyropteridae</i>	1 (5)	Chauve-souris à ventouses ("disc-winged bat")	Nouveau monde, zone tropicale	Amérique du Sud
		<i>Miniopteridae</i> *	1 (23)	Minioptère (<i>Miniopterus</i> sp.)	Insectes	Ancien monde
		<i>Cistugidae</i>	1 (2)	("mouse-eared bat")	Insectes	Sud de l'Afrique
		<i>Vespertilionidae</i> *	48 (456)	Vespertilion, murin (<i>Myotis</i> sp.) Noctule (<i>Nyctalus</i> sp.) Oreillard (<i>Plecotus</i> sp.) Pipistrelle (<i>Hypsugo</i> sp., <i>Pipistrellus</i> sp.) Barbastelle commune (<i>Barbastella</i> sp.) Sérotine (<i>Eptesicus</i> sp., <i>Vespertilio</i> sp.)	Insectes	Monde

Ces 20 dernières années, la multiplication des données moléculaires a permis d'affiner la phylogénie des différentes familles de chiroptères (Jones *et al.*, 2002).

La phylogénie actuelle des microchiroptères a cependant longtemps été controversée. Kirsch et Pettigrew (1998) réfutent par exemple l'hypothèse que la famille des *Rhinolophidae* serait phylogénétiquement plus proche des mégachiroptères que des autres familles de microchiroptères. Ceci serait dû à plusieurs biais selon leur théorie : (i) un grand nombre de synapomorphies existe entre les microchiroptères appartenant aux sous-ordres *Yinpterochiroptera* et *Yangochiroptera* (incluant l'écholocation); (ii) la forte proportion d'adénine et de thymine (AT) dans les génomes des chiroptères sous-estimerait les réelles différences entre les mégachiroptères et les rhinolophes par l'étude des génomes (Pettigrew, 1994; Pettigrew et Kirsch, 1998). Les études récentes associant la paléontologie et les analyses génétiques, valident cependant la paraphylie des microchiroptères et apportent des données importantes sur l'origine et l'histoire évolutive des chiroptères (Teeling *et al.* 2005; Teeling 2009; Jones *et al.* 2002; Springer 2013).

II. A.3. Origine et histoire évolutive des chiroptères

Les chiroptères auraient divergé en deux sous-ordres *Yinpterochiroptera* et *Yangochiroptera* il y a 60 millions d'années (Ma). *Onychonycteris finneyi*, datant de l'éocène (52 Ma) est le plus ancien fossile chiroptère retrouvé (figure 8). Au cours de cette ère, qui est la plus chaude du cénozoïque, les températures tropicales favorisant l'augmentation de la diversité des angiospermes et des insectes, ce qui créa de nouvelles niches écologiques exploitables. La diversification des chiroptères en réponse à l'exploitation de ces divers nouveaux environnements, était maximale il y a 30 à 50 Ma (Jones, Bininda-Emonds et Gittleman 2005).

Simmons (2005) qualifia cette radiation évolutive importante de "big bang de l'Eocène". Elle concerne les régimes alimentaires et les stratégies de vol. L'écholocation se diversifia et devint plus affinée chez les quatre super-familles de microchiroptères (*Emballurionidea*, *Vespertilionidea*, *Noctillionidea* et *Rhinolophidea*) (Simmons, 2005).

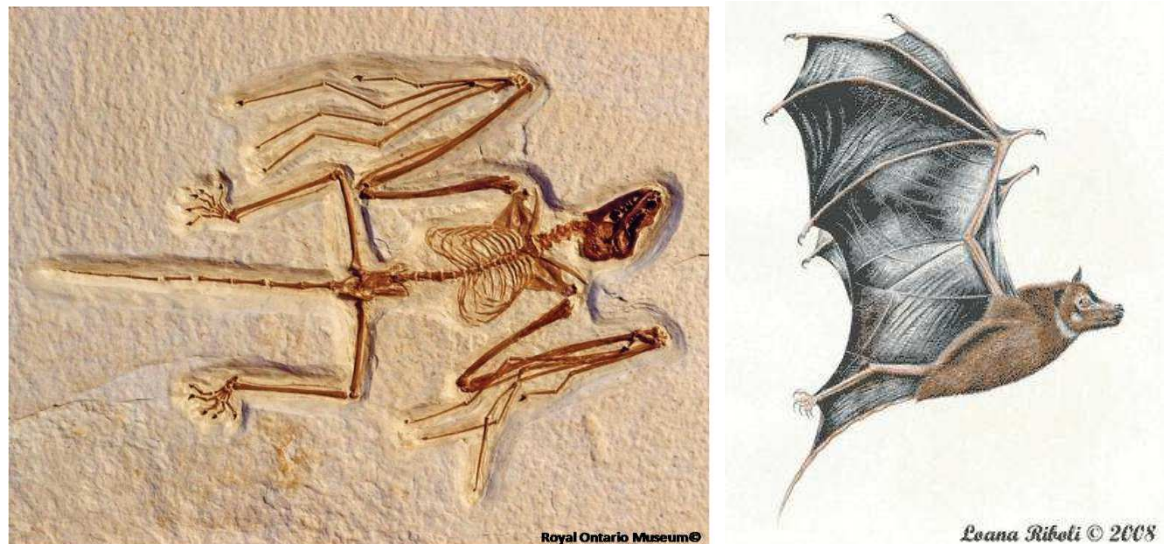


Figure 8 : A gauche : Photographie du fossile d' *Onychonycteris finneyi*, le plus ancien fossile chiroptère retrouvé (Musée royal de l'Ontario). A droite : La représentation de la probable apparence de *O. finneyi* (Loana Riboli, 2008). Le fossile date de l'Eocène, au début de l'ère tertiaire (cénozoïque). Il a été retrouvé en actuelle Amérique du Nord (Colorado et Wyoming) dans la carrière de la Rivière verte. Il est pourvu d'un système d'écholocation très rudimentaire, et n'est pas capable de voler, mais il est apte à planer ou effectuer des battements d'ailes (Gunnell et Simmons 2005).

D'après les indices paléontologiques et moléculaires, les chiroptères seraient originaires de Laurasia (figure 9) : les *Yangochiroptera* auraient émergé en Amérique du Nord et se seraient ensuite déplacés vers les autres continents grâce à leur aptitude à voler (Teeling *et al.*, 2005).

Le sous-ordre des *Yinpterochiroptera* serait apparu au niveau de la région asiatique et se serait diversifié en deux sous-familles au paléocène inférieur (-58 à -55 Ma) : les *Rhinolophidae* et les *Pteropodidae* (Teeling, 2009; Almeida *et al.*, 2011). Ils auraient ensuite progressivement colonisé les territoires de l'ancien monde (l'Afrique, l'Europe et l'Asie).

L'écholocation, qui ne serait apparue qu'une seule fois au cours de l'histoire évolutive, aurait été perdue chez les ptéropodidés (Teeling *et al.*, 2000; Springer *et al.*, 2001).

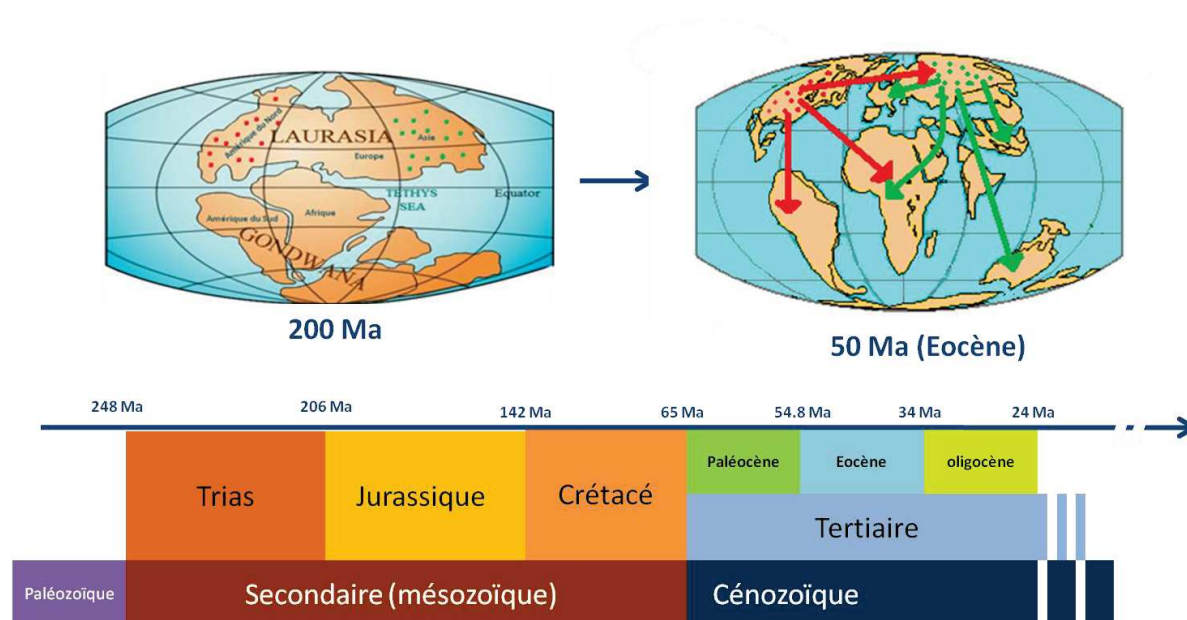


Figure 9 : Schéma illustrant l'évolution de la Pangée à l'échelle des temps géologiques. Les chiroptères seraient originaires de Laurasia. Les *Yangochiroptera* proviendraient d'Amérique du Nord et auraient colonisé la surface du globe (symboles rouges). Les *Yinpterochiroptera* (vert), originaires d'Asie, auraient colonisé les territoires de l'ancien monde (Afrique, Asie, Europe).

II. A.4. Les chiroptères, des mammifères aux caractéristiques biologiques et écophysologiques particulières

Le vol et l'écholocation sont les caractéristiques principales qui distinguent les chiroptères des autres mammifères (Arita et Fenton, 1997). En s'adaptant ainsi au vol, les chiroptères ont optimisé leur morphologie et ont également développé d'autres caractéristiques physiologiques spécifiques, comme l'écholocation ou un métabolisme exceptionnel pour minimiser le coût énergétique dépensé lors des déplacements (Norberg, 1985, 1994). Ces caractéristiques qui font des chiroptères des êtres si particuliers, sont détaillées dans cette partie. Elles nous permettront de comprendre plus tard (partie II.B), en

quoi ces avantages biologiques influent sur l'importance des chiroptères en tant que réservoirs de zoonoses virales émergentes.

II. A.4.1. L'écholocation

II. A.4.1.a. La découverte de l'écholocation chez les chiroptères

L'abbé et biologiste italien Lazzaro Spallanzani (1729-1799) a effectué en 1794 des expériences cruelles mais pionnières sur les chiroptères. Avec son confrère Louis Jurine, il a supprimé la vision des chauves-souris, pour prouver que celles-ci continuaient à se déplacer aisément. En leur obstruant la bouche et les oreilles, ils ont montré que celles-ci restaient au sol. Il a été le premier à évoquer l'hypothèse de la "vision acoustique" chez ces mammifères.

D. Griffin réitéra les expériences de Spallanzani en 1937 avec un détecteur d'ultrasons. Il fut le premier à enregistrer des ultrasons émis par des chiroptères. Il démontra qu'en leur obstruant l'orifice buccal, ces derniers étaient incapables d'émettre des ondes tandis, qu'en obstruant leurs oreilles, ils étaient incapables de s'orienter. Il prouva alors que les chiroptères étaient aptes à se localiser en utilisant l'écho, et a appelé ce phénomène "l'écholocation".

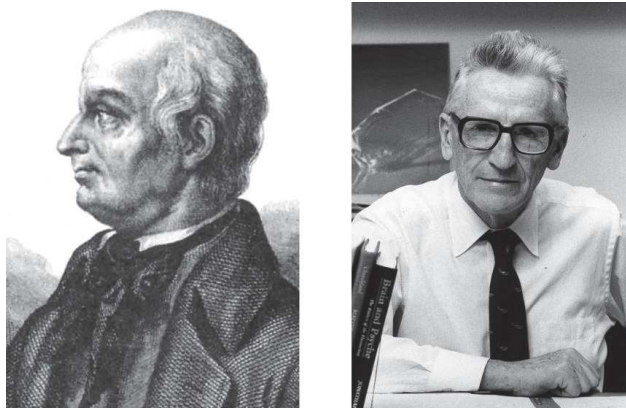


Figure 10 : Les deux pionniers de la découverte de l'écholocation chez les chiroptères : Lazzaro Spallanzani (1729-1799) à gauche, Donald Griffin (1915-2003) à droite.

L'écholocalisation consiste à envoyer des ultrasons et en écouter les échos pour se localiser (figure 11). C'est le système des sonars, aujourd'hui utilisé dans de nombreuses disciplines.



Figure 11 : Schéma simplifié de l'écholocalisation. Les chiroptères émettent des ondes ultrasons pour s'orienter et chasser leurs proies. En présence d'un obstacle ou d'une proie, les ondes sont réfléchies et l'écho, détecté par les chiroptères. Le délai entre l'émission et la réception de l'écho renseigne l'animal sur la distance de l'obstacle, et la déformation de l'écho, renseigne sur sa nature.

II. A.4.1.b. Fonctionnement de l'écholocalisation chez les chiroptères

Les microchiroptères sont capables d'écholocalisation et ont une anatomie spécifique : le pharynx produit les ondes ultrasons : elles sont focalisées et amplifiées au niveau de la trachée ou de la feuille nasale de l'animal (Pedersen et Müller, 2013). La réception des ultrasons se fait au niveau de l'oreille interne : l'arrivée des ondes sonores sur le tympan engendre des vibrations de la membrane basilaire dans la cochlée. Ces vibrations sont ensuite intégrées et analysées par le cortex auditif et permettent une visualisation 3D de l'environnement et une adaptation des ultrasons émis en retour (Veselka *et al.*, 2010). Les chiroptères produisent des sons d'une durée variant entre 0,3 et 300 ms et de fréquence variant de 8 à 210 kHz. La plupart de ces ultrasons sont inaudibles pour l'Homme, qui n'est capable de percevoir que des fréquences de 18 Hz à 20 kHz. Trois principaux types d'ondes sont émis par les chiroptères

pour leur permettre de s'orienter et chasser efficacement (table 4). L'écholocation est sophistiquée : en fonction des situations, les microchiroptères sont capables d'émettre des ultrasons de fréquence et d'intensité différentes, sur des durées et harmoniques variables (Hiryu *et al.*, 2010; Fenton, 2013)

Tableau 4 : Caractéristiques et rôles des différents types d'ondes émises par les chiroptères capables d'écholocation.

Types d'ondes émises par les microchiroptères	Rôles	fonctionnements
Ondes de fréquence constante (FC)	Détection des proies de taille supérieure à la longueur d'onde du signal Evaluation de la vitesse de déplacement d'une proie	La mesure de la durée entre l'émission d'un ultrason et la réception de son écho permet d'analyser la distance de la cible. Prise en compte de l'effet Doppler
Ondes de fréquence modulée et décroissante (FM)	Localisation précise des proies et appréciation des distances	La mesure de l'écart entre les réceptions au niveau des deux oreilles permet d'appréhender la direction de la cible.
Ondes mixtes (FC-FM)	Caractérisation fine des proies, poursuite des proies	La déformation de l'écho renseigne sur le type de cible : par exemple, un battement d'aile d'insecte déforme l'écho de manière caractéristique.

II. A.4.1.c. L'écholocation chez tous les chiroptères?

L'écholocation, qui ne serait apparue qu'une seule fois au cours de l'histoire évolutive, aurait été perdue chez les ptéropodidés (Teeling *et al.*, 2000; Springer *et al.*, 2001). En devenant frugivores ou nectarivores, les mégachiroptères auraient développé leur olfaction (Raghuram *et al.*, 2009), audition et acuité visuelle nocturne (Ollivier *et al.*, 2004), au détriment de l'écholocation qui servait initialement à repérer les insectes (Jones et Teeling, 2006).

Les mégachiroptères utilisent cependant des cliquetis avec la langue pour s'orienter. Ce système est moins sophistiqué que l'écholocation, mais son efficacité ne doit pas être sous-

évaluée. Holland *et al.* (2004) ont démontré que la roussette d'Egypte (*R. aegyptiacus*) semble appréhender l'environnement avec une résolution comparable à celle des microchiroptères (Holland *et al.*, 2004). Pour certains, cette stratégie est considérée comme une convergence évolutive (Li *et al.*, 2008).

De plus, Boonman a récemment démontré que de nombreux ptéropodidés (*Eonycteris*, *Cynopterus* et *Macroglossus*) produisaient des cliquetis avec leurs ailes dont les échos permettent de détecter et discriminer des objets dans l'obscurité. Ce système de repérage n'est pas la forme ancestrale de l'écholocation mais serait plutôt un comportement primitif, propre à ces chiroptères (Boonman *et al.*, 2014).

II. A.4.2. La capacité à voler

Les chiroptères sont les seuls mammifères capables de voler. Comme le nom l'indique (du grec "chiro-" signifiant "main" et "ptera" signifiant "aile"), l'aile des chiroptères possède un avant-bras, des métacarpiens et phalanges allongés (Cooper et Sears, 2013). Ils soutiennent les membranes de peau très fine et très nervurée qui forment la surface portante de l'aile (patagium) (Norberg, 1994). Cette morphologie est très différente de celle de l'oiseau, dont l'aile possède un nombre très réduit d'os (figure 12).

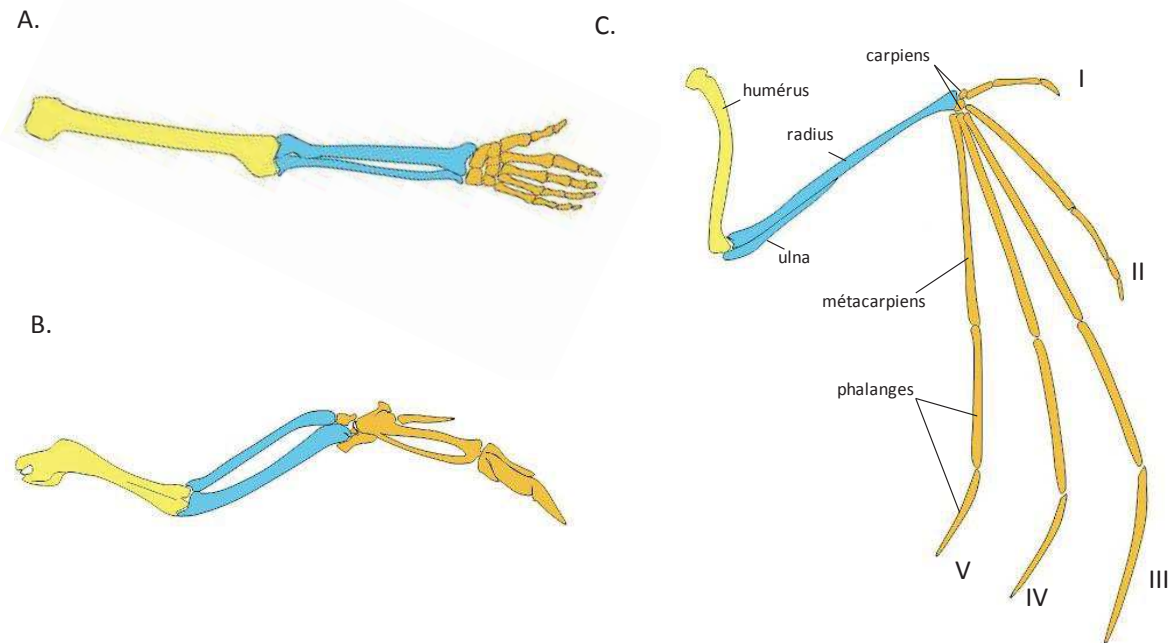


Figure 12 : Schéma comparatifs simplifié des os des membres antérieurs chez les Hommes (A), les oiseaux (B) et les chiroptères (C), (modifié d'après Cooper et Sears 2012). Les trois principales parties stylopode, zeugopode et autopode de l'ossature sont représentées respectivement en jaune, bleu et orange. L'échelle n'est pas respectée sur ce schéma. Chez les chiroptères, la partie autopode est divisée en cinq doigts (I, II, III, IV, V) qui soutiennent le patagium.

La proportion des membres antérieurs du plus ancien fossile chiroptère retrouvé (*Onychonycteris finneyi*) prouverait qu'il n'était pas encore capable de vol *sensus stricto*, mais d'évoluer d'arbre en arbre en planant (Norberg, 1985). D'après les analyses morphologiques sur l'ensemble des fossiles, l'aptitude au vol aurait été acquise ensuite au cours de la radiation évolutive de l'Eocène vers environ -58 Ma, puis évolué parallèlement chez les *Yinpterochiroptera* et *Yangochiroptera*. Les études moléculaires sur ces fossiles sont favorables à la théorie du "flight first", selon laquelle la capacité à voler aurait été acquise avant celle de l'écholocation (Adams et Shaw, 2013).

L'aptitude au vol permet aux chiroptères de se déplacer sur de relatives longues distances. Dans les environnements aux fortes variabilités saisonnières, les microchiroptères

présents sont capables de migration jusqu'à 2000 km (*Pipistrellus nathusii*) (Fleming *et al.*, 2003). Dans les zones tropicales et sub-tropicales, les chiroptères sont majoritairement sédentaires. Néanmoins, les mégachiroptères peuvent se déplacer sur plusieurs dizaines de kilomètres chaque nuit à la recherche de nourriture (Fleming *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2015), et jusqu'à 50 km selon Marshall (1983). Seules quelques études rapportent quelques cas de migration chez les mégachiroptères (jusqu'à 750 km) pour garantir l'accès aux ressources (par exemple *Eidolon*, *Epomophorus*, *Pteropus*, *Rousettus*, *Myonycteris*, *Nanonycteris*) (Thomas 1983; Marshall 1983).

Pour permettre le vol, de nombreuses adaptations morphologiques et physiologiques ont été mises en place au cours de l'évolution, comme par exemple l'allongement des os des membres antérieurs, ou la forte vascularisation des ailes qui permet la régulation thermique lors du vol (Simmons *et al.*, 2008). Le métabolisme des chiroptères est également une caractéristique clé de l'adaptation au vol, et est détaillé dans le sous-chapitre suivant.

II. A.4.3. Un métabolisme et une longévité remarquables

De nombreuses études démontrent que le coût énergétique lié au vol et à l'écholocation, est extrêmement élevé chez les chiroptères. Thomas et Suthers (1972) ont montré que l'activité métabolique chez le phyllostome fer-de-lance (*Phyllostomus hastatus*) est multipliée par 34 lors du vol. En comparaison, chez les rongeurs de même taille, elle est multipliée par 6 à 8 fois selon les espèces, lors d'une activité physique intense. Les phyllostomes produisent jusqu'à 14 battements de cœur par seconde lors du vol (Thomas et Suthers, 1972). Cet exemple illustre l'aptitude des chiroptères à développer un métabolisme incroyable qui est une caractéristique généralisable à l'ensemble des chiroptères. Nous allons exposer quelques aspects physiologiques et écologiques essentiels qui permettent d'expliquer comment ces

animaux peuvent gérer cette turbine métabolique qui entraîne pourtant une intense production de chaleur et de déchets métaboliques.

II. A.4.3.a. Un métabolisme capable de réduire le stress oxydatif

Au cours de l'activité métabolique, la réduction de l'oxygène en sous-produits appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO), engendre un stress oxydatif important pour les cellules. Ces ERO sont des dérivés non radicalaires ou des radicaux libres oxygénés. Ces éléments cytotoxiques peuvent endommager l'ADN mitochondrial, agir sur les télomérases et induire une entrée en sénescence prématurée des cellules (Passos et von Zglinicki, 2005). Chez les chiroptères, ce stress oxydatif généré semble remarquablement faible en dépit de l'énergie qu'ils peuvent dépenser lors du vol (Brunet-Rossinni, 2004; Wilhelm Filho *et al.*, 2007). Ceci expliquerait la longévité remarquable de ces mammifères. Il a été démontré qu'à consommation égale d'oxygène, la petite chauve-souris brune (*Myotis lucifus*), dont la longévité maximale est estimée à 34 ans, produirait 2,3 fois moins de radicaux oxygénés que les musaraignes, dont l'espérance maximale de vie est de 2 ans (Brunet-Rossinni, 2004).

Les scientifiques ont mis en évidence plusieurs déterminants de la modulation du stress oxydatif à un niveau faible chez les chiroptères :

(i) Chez ces animaux, les ERO seraient neutralisés de manière très efficace dès leur formation au niveau des mitochondries, par des antioxydants et un arsenal d'enzymes (superoxyde dismutase) évitant des dommages cellulaires trop importants, retardant la mort cellulaire (Brook et Dobson, 2015).

(ii) La respiration cellulaire lors de l'activité métabolique est assurée au niveau des mitochondries et accumulés en très forte quantité au niveau des tissus adipeux bruns, présents en grande proportion chez les chiroptères.

(iii) Chez les ptéropodidés, le régime alimentaire frugivore ou nectarivore est naturellement faible en ERO et permet de réduire l'apport exogène d'oxydants. Il constitue également une source importante en vitamines E et C, caroténoïdes et polyphénol, qui sont des antioxydants naturels (Wilhelm Filho *et al.*, 2007).

II. A.4.3.b. Le contrôle de la température corporelle et du stress oxydatif par la torpeur et l'hibernation

Les chiroptères sont hétérothermes. En ayant la capacité de moduler leur température corporelle en fonction de la température extérieure, les chiroptères peuvent également moduler leur activité métabolique (Geiser *et al.*, 1996; Geiser et Brigham, 2000; Geiser et Stawski, 2011).

Les chiroptères sont capables de rentrer en phase de torpeur, sorte d'état de repos où ils ralentissent le rythme de leur organisme (Geiser et Ruf, 1995). L'entrée en torpeur permet d'abaisser la température corporelle, qui s'accompagne d'une diminution de 50% à 99% de l'activité métabolique, selon les espèces (Herreid, 1963; Hock, 1951; McNab, 1989; Geiser *et al.*, 1996). Cette stratégie contrebalancerait l'énorme énergie dépensée et l'augmentation de température lors du vol. Elle est mise en place au cours de la journée par 96.7% des chiroptères dans les régions tropicales et sub-tropicales : on parle de torpeur diurne (Geiser et Stawski, 2011). Chez les renards volants ou roussettes (genre *Rousettus*), une fois suspendus sur leur support, le déploiement des ailes permet également de ventiler leurs organismes et le rabattement des ailes, de les protéger contre les pics de chaleur.

Lorsque cet état de torpeur dure plusieurs jours voire semaines, on parle d'hibernation (Geiser et Ruf, 1995). Cette stratégie est adoptée par de nombreuses espèces de microchiroptères dans les zones tempérées pour faciliter le passage de la saison hivernale. L'entrée en léthargie des espèces hivernantes s'accompagne d'une forte baisse de la température corporelle, ajustée à celle de l'environnement, et d'un ralentissement du rythme cardiaque jusqu' à un battement par minute chez certaines espèces (Geiser et Ruf, 1995; Currie *et al.*, 2015).

Enfin, lors du vol, la vasodilatation des nombreux vaisseaux sanguins au niveau du patagium permet également de réguler la température corporelle, par contact avec l'air (Reeder et Cowles, 1951).

II. A.5. Les chiroptères en Asie du Sud-Est

L'Asie du Sud-Est (ASE) est un point chaud de diversité. Trente pour cent des mammifères de cette région sont des chiroptères. De plus, l'ASE regroupe 30% des chiroptères de la planète, dont 9 familles (Tsang *et al.* 2016). Celles qui seront évoquées dans cette thèse sont colorées en gris dans le [tableau 3](#) précédent (page 56). Les chiroptères cavernicoles sont présents majoritairement dans les domaines karstiques et les affleurements présentant des crevasses ou grottes. De nombreuses espèces frugivores et insectivores sont dépendantes des forêts et trouvent leur abris sous le feuillage des arbres ou dans la canopée. Les espèces anthropophiles, la plupart insectivores, trouvent abris au niveau des toits des terrasses ou des bâtiments. Les renards volants s'investissent souvent près des temples bouddhistes, où ils peuvent évoluer sans être perturbés, ni chassés par l'Homme.

II. A.5.1. Le rôle écologique et économique des chiroptères en Asie du Sud-Est

La très forte diversité des types d'habitats et régimes alimentaires des chiroptères fournit un avantage écologique souvent sous-estimé par l'Homme. Les chiroptères insectivores interviennent dans le contrôle des populations d'arthropodes et les chiroptères frugivores, dans la dissémination des graines ou encore dans la pollinisation des plantes (Calisher *et al.* 2006). Dans certaines régions du globe, notamment en Asie, les chiroptères représentent une source de gibier pour l'alimentation humaine. Le guano est de même valorisé en tant qu'engrais en agriculture.

II. A.5.1. a. Les chiroptères impliqués dans la pollinisation des angiospermes et dans la dispersion des graines

Dans les zones de tropiques, jusqu'à 99% des plantes à fleurs (angiospermes) sont pollinisées par les animaux, *i.e.* insectes, oiseaux et chiroptères (Bawa, 1990). Il a été calculé que 528 espèces d'angiospermes d'intérêts économique et agronomique (appartenant à 67 familles et 28 ordres) étaient pollinisées par des chiroptères nectarivores (Fleming, Geiselman et Kress, 2009).

Les chiroptères pollinisateurs appartiennent aux familles des *Pteropodidae* et *Phyllostomidae*, respectivement issus des sous-ordres *Yinpterochiroptera* et *Yangochiroptera*. Ils ont une distribution tropicale et sub-tropicale (Kunz et Fenton, 2005).

Chez les ptéropodidés, 6 genres et 15 espèces de la sous-famille *Macroglossinae* ont évolué il y a 26-28 Ma vers un régime alimentaire frugivore à nectarivore. La spécialisation à l'alimentation nectarivore aurait évolué indépendamment plusieurs fois chez les

Macroglossinae au cours du temps, en Asie, en Australie et plus récemment en Afrique. En Asie du Sud-Est, la principale espèce pollinisatrice est *Eonycteris spelaea*.

Chez les phyllostomes, seuls les chiroptères de la sous-famille *Glossophaginae* se sont spécialisés vers ce régime alimentaire. Au cours de l'évolution, leur museau est devenu plus allongé avec des feuilles nasales réduites et une langue pourvue d'un système papillaire très perfectionné pour aspirer efficacement le nectar par capillarité (Gonzalez-Terrazas *et al.*, 2012) (figure 13 A et B).

D'autres genres de ptéropodidés et phyllostomes sont qualifiés de "pollinisateurs opportunistes". Ils ne se nourrissent pas directement de nectar, mais en cherchant des fruits ou insectes, ils butinent les angiospermes et emportent avec eux des pollens qu'ils disséminent. C'est le cas de certains ptéropodidés du genre *Pteropus* (figure 13 G) et *Epomorphus* (figure 13 H) (Fleming, Geiselman, et Kress 2009), et des phyllostomes du genre *Artibeus* (figure 13 C) et *Phyllostomus* (figure 13 D).

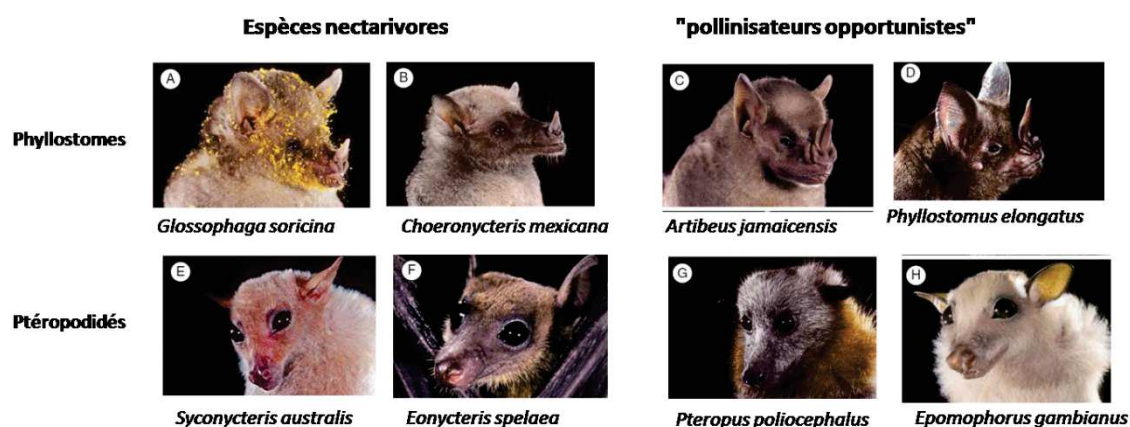


Figure 13 : Exemple d'espèces de chiroptères pollinisateurs et pollinisateurs opportunistes appartenant à la famille des *Phyllostomidae* et des *Pteropodidae*. A, B : phyllostomes nectarivores, retrouvées principalement en Amérique centrale et du Sud. C, D : les phyllostomes "pollinisateurs opportunistes". E, F : espèces nectarivores de la famille des ptéropodidés, Asie du Sud-Est. G, H : espèces de "pollinisateurs opportunistes" de la famille des *Pteropodidae* : (G) *Pteropus poliocephalus* (750 g) d'Australie, *Epomophorus gambianus* (100 g) d'Afrique sub-saharienne (photo de Merlin D. Tuttle, Bat Conservation International).

Les chiroptères permettent d'acheminer une grande quantité de pollen d'une fleur à une autre, sur des distances relativement longues. Les *Eonycteris* sont, par exemple, capables de butiner à une distance pouvant aller jusqu'à 50 km de leur abri (Gould, 1978; Marshall, 1985). En déposant une grande quantité de variants génotypiques de pollen, les chiroptères contribuent à la diversité des angiospermes (Kelm *et al.*, 2008). Les ptéropodidés frugivores permettent la dispersion des graines à travers différents écosystèmes et parfois même l'introduction de nouvelles espèces de plantes dans des écosystèmes insulaires (Whittaker *et al.*, 1992) ou perturbés (Kelm *et al.*, 2008). A plus grande échelle, les chiroptères contribuent au maintien et à la diversité des forêts tropicales et équatoriales (Fleming *et al.*, 2009).

En Thaïlande, l'étude du régime alimentaire des *Eonycteris* a montré qu'ils se nourrissaient principalement sur des plantes ayant un intérêt économique important pour le pays (Bumrungsri *et al.*, 2013), en particulier les bananiers (*Musa* sp.). C'est également le principal pollinisateur du durian (*Durio* sp.), fruit reconnu en ASE pour ses valeurs gustatives et olfactives indéniables (Bumrungsri *et al.*, 2009).

II. A.5.1.b. Les chiroptères contribuent au contrôle des populations d'insectes et ont un impact positif sur les forêts tropicales et la sylviculture

Plus de deux tiers des espèces chiroptères sont capables de se nourrir d'insectes (Kunz *et al.* 2011). La diversité des arthropodes consommés (lépidoptères, coléoptères, homoptères, hémiptères, diptères) par des colonies de millions de chiroptères, permet une régulation importante des populations d'insectes (Kalka *et al.*, 2008). En Thaïlande, les grottes de Khao Chong Pran (province de Ratchaburi) abritent 2,6 millions de Tadarides (*Tadarida plicatus*) qui ingèrent chaque nuit, jusqu'à la moitié de leur poids en insectes (8 g) provenant des rizières alentours : au minimum, 17,5 tonnes d'insectes seraient consommées chaque nuit

(Leelapaibul *et al.*, 2005). La consommation des chiroptères varie considérablement en fonction des espèces, des saisons et du cycle de reproduction. En période de lactation, les microchiroptères ingèrent, chaque nuit, au minimum 70% de leur masse corporelle en insectes (Kunz *et al.*, 1995, 2011).

A l'échelle mondiale, la consommation des insectes par les chiroptères atteint des millions de tonnes, incluant notamment des espèces susceptibles de ravager des cultures. Elle permet de palier naturellement à l'utilisation d'insecticides et de pesticides dans les cultures, dont l'utilisation excessive contribue à l'augmentation dramatique des résistances (Kunz *et al.* 2011). En effet, l'institut des ressources mondiales (WRI) a dénombré plus de 400 espèces parasites de cultures ayant développé des résistances à un ou plusieurs pesticide(s). Ce problème concerne 13% des cultures aux Etats-Unis (Kunz *et al.* 2011; Naylor et Ehrlich 2012), et la suppression des chiroptères dans le paysage agricole entraînerait une perte annuelle estimée à 3,7 milliards de dollars (Boyles *et al.*, 2011).

La gestion des écosystèmes par les chiroptères et leur valeur économique sont sous-évaluées en ASE, où elle reste peu documentée (Williams-Guillén *et al.*, 2016). Néanmoins, Leelapaibul a démontré l'impact positif du Tadaride de Thaïlande (*Tadarida plicata*) sur la gestion des cicadelles (*Sogatella furcifera*), hémiptère ravageur de riz en Thaïlande (Leelapaibul *et al.*, 2005). La prédation de ce parasite par ce chiroptère permettrait d'économiser 1,2 million de dollars et de prévenir la perte de près de 2900 tonnes de riz par an, assez pour nourrir la population entière du pays pendant une semaine (Redfern *et al.*, 2012). En Indonésie, il est estimé que l'exclusion des chiroptères sur les plantations de cacao engendrerait une baisse des récoltes de 20 %, soit une perte de 520 \$ par hectare (Maas *et al.*, 2013). Maas démontre également l'importance de la prédation par les chiroptères insectivores dans la conservation des forêts tropicales indonésiennes et l'économie associée à la sylviculture (Maas *et al.*, 2015).

II. A.6. L'implication des chiroptères dans l'économie en Asie du Sud-Est

II. A.6. 1. Les chiroptères, une viande de brousse

En ASE, 56 espèces de chiroptères, soit 17% de la population totale des chiroptères sont chassées (Mildenstein *et al.*, 2016). Cette pratique est présente dans 10 des 11 pays de la région (Brunei, Myanmar, Cambodge, Indonésie, Laos, îles Timor, Malaisie, Philippines, Thaïlande et Vietnam), à l'exception de Singapour (Mildenstein *et al.*, 2016). Le manque de régulation de ces pratiques constitue une vraie menace pour les populations chassées : parmi les 92 espèces de ptéropodidés chassés dans le monde, 66% d'entre elles sont sur la liste rouge de l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) des espèces menacées d'extinction (Mildenstein *et al.*, 2016).

Les chiroptères sont une viande de brousse prisée pour ses qualités gustatives et nutritionnelles, supérieures à la viande issue des animaux d'élevage (Abulude, 2007). Ils représentent une alternative pour les populations aux ressources limitées. Les produits de la chasse sont, pour la plupart, destinés à la consommation familiale, mais peuvent également être vendus localement sur les marchés. C'est le cas au Cambodge et au Laos.

Les produits dérivés de ces animaux sont également prisés par d'autres pays. L'ajout des ptéropodidés par la CITES (Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction) en 1987-1989 à la liste des espèces à protéger, a permis de mettre un terme au commerce international de ces espèces. Cependant, le marché noir persiste (Samuel, 2013). Au Cambodge et au Laos, ce commerce officieux de chiroptères existe (WCS, communication personnelle), mais est peu documenté.

II. A.6. 2. L'utilisation des chiroptères en médecine traditionnelle

La médecine traditionnelle utilisant des produits issus de la faune et la flore sauvages est une pratique ancestrale profondément ancrée dans la culture asiatique (Tuladhar-Douglas, 2008; Lee *et al.*, 2014). Les chiroptères sont encore prisés aujourd'hui pour la confection des remèdes traditionnels (Walker, 2005), malgré la mise en place de lois protégeant la plupart des espèces en ASE (Mickleburgh *et al.*, 2002; Mildenstein *et al.*, 2016). Le déclin de la population de roussettes de Malaisie (*Pteropus vampyrus*) sur l'île de Bornéo est une conséquence (Mohd-Azlan *et al.*, 2001). Au Cambodge, une seule étude expose l'utilisation des chiroptères pour la médecine traditionnelle (Ashwell et Walston, 2008). Ces pratiques sont rarement révélées au grand jour, ce qui rend quasi impossible l'évaluation des risques de potentielle transmission de virus de ces animaux à l'homme. Des investigations sur cet aspect de santé publique sont nécessaires, mais il est difficile d'obtenir la confiance et la collaboration des populations locales (Mildenstein *et al.*, 2016).

II. A.6. 3. La récolte du guano issu des chiroptères permet la fertilisation des sols et est une source de revenu

Le guano produit par les chiroptères contient des concentrations importantes d'azote et de phosphate, principalement issus des parties non digérées des insectes (Gillieson, 1996). Il peut être utilisé ultérieurement comme fertilisant pour l'agriculture, et représente une alternative aux engrais chimiques. A ce titre, l'excavation du guano dans les grottes est une pratique courante. Elle est rapportée en République démocratique du Congo, Thaïlande et Amérique du Sud (Li *et al.* 2010; Nzuki, Kinkwono et Sekle 2011; Wacharapluesadee *et al.* 2013). Cette activité existe également au Laos, dans la grotte de "Tham Chia", dans la province d'Oudomxay. La vente du guano est une source de revenu importante pour les populations locales : en Thaïlande, un kilogramme serait vendu entre 0,5 et 27 \$ selon les

régions et le type de guano. Dans la province de Ratchanaburi, la vente du guano collecté près du temple de Khao Chong Pran rapporterait 135 000 \$ par an (Leelapaibul *et al.*, 2005).

Le guano produit par les chauves-souris constitue également une source d'énergie primaire dans les écosystèmes cavernicoles dont dépend la survie de nombreuses espèces d'invertébrés, d'amphibiens et de poissons coprophages (Fenolio *et al.*, 2006). Ces espèces, désignées comme "guanophiles", sont hautement adaptées et strictement endémiques de ces écosystèmes (Furey et Racey, 2016).

Au Cambodge, outre le ramassage du guano issu des chiroptères cavernicoles, des fermes spécialisées dans la collecte de guano existent (Thi *et al.*, 2014). Dans ces fermes, des colonies de *Scotophilus kuhlii* s'établissent sous des abris construits par l'Homme ou des palmiers à sucre (*Borassus flabellifer*), près des zones de rizières et des parcelles d'eau. Le guano est récupéré régulièrement au pied des abris puis destiné à la vente (figure 14). Cette pratique existe depuis les années 60, et on recense actuellement des fermes de guano dans 10 des 24 provinces du pays (Kandal, Takeo, Pursat, Battambang, Banteay Meanchey, Kampong Cham, Siem Reap, Kampot et Prey Veng). Cette activité existe également au Vietnam où les abris sont remplacés par des maisonnettes construites à partir de feuilles de palmier (figure 14D) (Chhay, 2012).

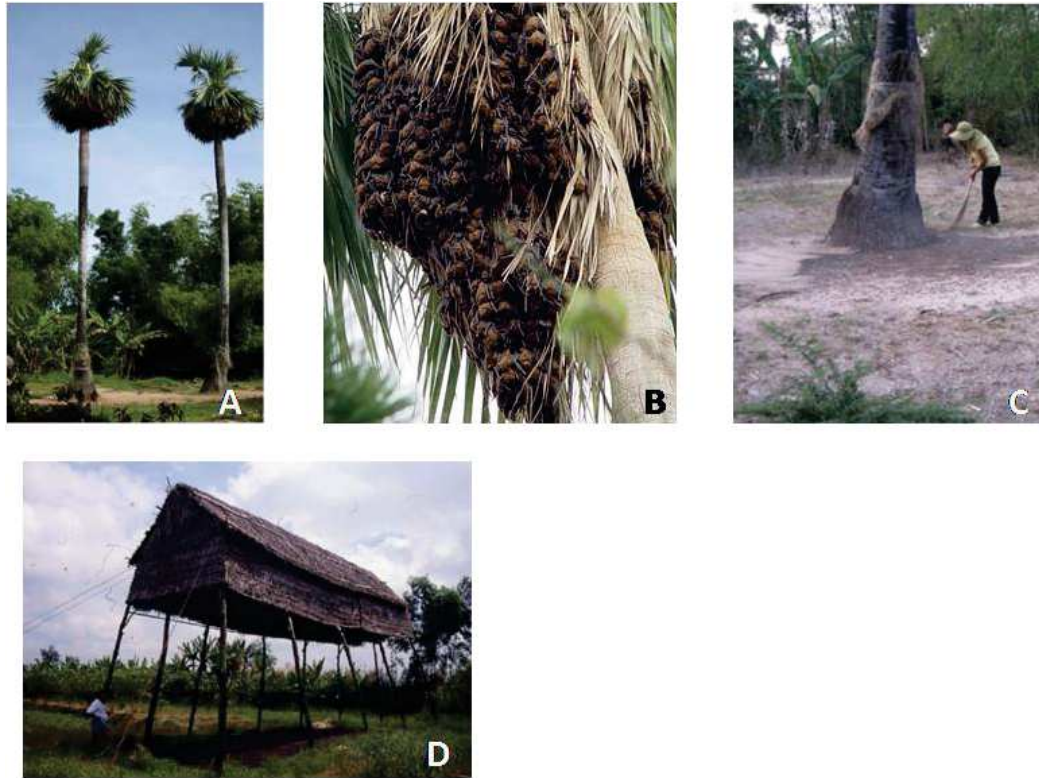


Figure 14 : Les fermes de guano au Cambodge : des palmiers abritant des colonies de *Scotophilus kuhlii* (A, B) dans une ferme de la province de Takeo. La collecte du guano au pied des arbres (C). Au Vietnam (D), les abris sont remplacés par des maisonnettes (source photos : Chhay Sokmanine, 2012).

II. A.6. 4 . La valorisation touristique des chiroptères au Cambodge et au Laos

Les visites des grottes de chauves-souris sont des attractions touristiques de plus en plus prisées et constituent une source de revenu pour l'économie locale. Au Cambodge et au Laos elles se développent. Le site le plus connu est à Battambang, où les touristes viennent chaque jour au crépuscule, observer l'envol d'une colonie de 4 millions de chauve-souris (*Chaerephon plicatus*) depuis la grotte de Phnom Sampeau. Ce type d'attraction est également proposé dans les provinces Cambodgiennes de Kampong Thom (chiroptères frugivores) et de Kampot (chiroptères cavernicoles), ainsi qu'au Laos dans la grotte de "Tham Chia".

II. B. L'implication des chiroptères dans les zoonoses

II. B.1. L'historique de la découverte des virus chez les chiroptères

L'augmentation des découvertes de nouveaux virus chez les chiroptères ces dernières années est à relier avec l'intensification des études qui ont fait suite notamment aux zoonoses du SRAS et d'encéphalites à hénipavirus évoquées précédemment. A ce jour, près de 200 virus différents, dont une vingtaine associée à des pathologies humaines, ont déjà été isolés ou détectés chez 11 familles et 37 genres de chiroptères (Calisher, 2015). Ces virus sont listés dans le tableau en [Annexe 1](#), ainsi que leurs hôtes majeurs associés. Cette liste évolue très rapidement suite aux nombres de projets de recherche en cours dans le monde, et risque d'être rapidement obsolète.

II. B.2. Des caractéristiques biologiques et écologiques spécifiques aux chiroptères qui favorisent leur rôle de réservoir

La partie II. A. 4 de ce chapitre a évoqué les aspects biologiques qui font des chiroptères des êtres si particuliers. Dans cette partie, nous allons examiner les différentes caractéristiques écologiques et biologiques des chiroptères qui jouent un rôle majeur dans le maintien et la transmission de virus zoonotiques, et qui permettent de qualifier ces animaux d'importants réservoirs de zoonoses.

II. B.2.1. Leur nombre

Notons en premier lieu que les chiroptères sont très nombreux, puisqu'ils représentent 21% des mammifères sur la planète, soit le deuxième ordre de mammifères le plus nombreux du monde, après les rongeurs (Kunz et Fenton, 2005). Ils peuvent vivre en colonie de plusieurs centaines jusqu'à plusieurs millions d'individus (Calisher *et al.*, 2006). Ils s'établissent dans des arbres ou des grottes, où les contacts entre individus sont permanents. Autant d'aspects qui contribuent à une transmission rapide et efficace, voire à une amplification de virus (Drexler *et al.*, 2011).

II. B.2.2. La capacité à transporter des virus sur de longues distances

De par leur capacité à voler, les chiroptères peuvent déplacer et diffuser des virus dans l'environnement qu'ils explorent sur des distances relativement grandes, notamment en cas de migration (O'Shea *et al.*, 2014). C'est notamment le cas des rhabdovirus dont la distribution géographique suit celle de ses hôtes (Brosset, 1990; Mondul *et al.*, 2003). Ainsi, en explorant de nouvelles aires, les chiroptères augmentent la probabilité de contacts avec de nouveaux hôtes, et par conséquent le risque de transmettre des pathogènes.

II. B.2.3. La capacité à transmettre les virus

Les chiroptères capables d'écholocation produisent des signaux en faisant vibrer le larynx. Ce mécanisme génère des fines gouttelettes de fluide nasopharyngé, de mucus ou de salive qui peuvent faciliter la transmission de virus par voie aérosolée (Calisher *et al.*, 2006), aux individus à proximité. Cette hypothèse a été étayée notamment par l'isolement de rhabdovirus dans le mucus de *Tadarida brasiliensis*, chiroptères de la famille des *Molossidae* (Constantine *et al.*, 1972).

II. B.2.4. Leur longévité

Il a longtemps été admis que les organismes à métabolisme très élevé ont une espérance de vie réduite. En effet, un métabolisme très actif engendre un stress oxydatif important qui conduit à un vieillissement cellulaire prématuré (Sohal et Orr, 1995). Cependant, la célèbre théorie du "rate of living" soulevée par Rubner (1908) et Pearl (1928) peine à s'appliquer aux chiroptères, qui peuvent facilement vivre 20 à 30 ans. Avec une si longue espérance de vie, les chiroptères peuvent accumuler de nombreux pathogènes au cours de leur existence, sans être directement affectés par l'infection de virus zoonotiques, qu'ils peuvent dès lors potentiellement transmettre lors de contacts avec l'Homme.

II. B.2.5. La variation saisonnière des hôtes réservoirs

Les infections virales des chiroptères peuvent perdurer chez leur hôte à de très faibles concentrations. Cependant, les taux d'infections virales des chiroptères évoluent en fonction de divers facteurs environnementaux (température, manque de ressources) ou biologiques (cycle de reproduction, etc.) (Plowright *et al.*, 2008; Wacharapluesadee *et al.*, 2010; Drexler *et al.*, 2011; Amman *et al.*, 2012; Escobar *et al.*, 2015; Hayman, 2015). Durant les périodes de reproduction et de post-partum, les taux d'infection des chiroptères augmentent au sein des colonies. Cela a été mis en évidence pour de nombreux virus comme les rhabdovirus, les hénipavirus (Plowright *et al.*, 2008), les filovirus (Leroy *et al.*, 2005; Amman *et al.*, 2012), les astrovirus ou encore les coronavirus (Drexler *et al.*, 2011). Ce phénomène est dû à des contacts plus nombreux durant les phases d'accouplement, qui favorisent les transmissions de virus entre individus. Par ailleurs, le stress physiologique et la modification de la réponse immunitaire, engendrés par la gestation et la lactation chez les femelles, favorisent la réplication virale chez ces mammifères. De même le taux d'infection dépend de l'évolution des ressources alimentaires, elles-mêmes dépendantes des changements climatiques et de

l'environnement par l'Homme. L'influence de la température extérieure sur le développement de la réponse immunitaire à médiation humorale a été démontrée chez les microchiroptères infectés expérimentalement par des alphavirus et flavivirus (Seymour *et al.*, 1978; Sulkin *et al.*, 1966). Dans le cas de chiroptères infectés par le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV), la réponse immunitaire à médiation humorale est inexistante en période d'hibernation (*Phyllostomus discolor*), même si le virus persiste dans les tissus.

II. B.2.6. Les infections virales persistantes

Plusieurs scénarios existent après une infection d'un chiroptère par un virus :

- (i) le virus peut infecter et persister chez les chiroptères sans causer de maladie. C'est le cas, par exemple, des virus Nipah, Marburg, ou du virus de l'encéphalite japonaise.
- (ii) le virus peut être transmis à d'autres hôtes susceptibles, avant qu'une réponse immunitaire n'élimine l'infection chez l'hôte chiroptère (virus ABLV, virus Tacaribe).
- (ii) le virus peut être transmis à d'autres hôtes susceptibles, avant que l'hôte chiroptère ne meure de l'infection par le pathogène. C'est le cas de certains variants de rhabdovirus.

Les deux premiers scénarios font des chiroptères de très bons réservoirs de maladies émergentes. Il a été prouvé que les chiroptères n'éliminaient pas totalement la présence du virus, mais étaient capables de limiter l'infection à une très faible charge virale. La capacité de vivre "avec" le virus permettrait d'en limiter les effets pathogènes. Elle est liée au métabolisme (i) et au mode de vie des chiroptères eux-mêmes (ii), mais aussi à une immunité très particulière (iii).

Lors du vol, l'augmentation de la température corporelle chez les chiroptères permet de diminuer l'infection virale, de la même manière que la réaction fébrile chez d'autres mammifères (Kluger *et al.*, 1998; O'Shea *et al.*, 2014). En outre, le vol permet la stimulation

du système immunitaire par celle du métabolisme (Brook et Dobson, 2015). A l'opposé, lors des périodes d'hibernation, la température corporelle et le métabolisme diminuent et seraient également associés à un ralentissement de la réplication virale (Sulkin et Allen, 1974; George *et al.*, 2011).

Les mitochondries jouent un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire de la réponse immunitaire (Arnoult *et al.*, 2009; Ohta et Nishiyama, 2011). Chez les chiroptères, leur présence en grand nombre, qui s'explique par un métabolisme élevé, et en particulier au niveau des tissus bruns adipeux, représenterait un avantage sélectif dans la mise en place des réponses immunitaires (Brook et Dobson, 2015).

L'immunité des chiroptères semble jouer un rôle prépondérant, même si nombre de ses mécanismes restent encore à élucider. Le chapitre suivant porte sur les connaissances actuellement acquises sur le sujet.

II. B.3. L'immunité des chiroptères

Comment les chiroptères peuvent-ils contrôler des infections virales qui sont mortelles chez d'autres mammifères? Les chiroptères étant des modèles biologiques difficiles à étudier, la recherche sur leurs mécanismes immunitaires avance très lentement. L'immunologie est une science très complexe, et les données semblent parfois contradictoires. C'est pourquoi il est encore aujourd'hui difficile d'expliquer précisément par quels mécanismes fins les chiroptères peuvent contrôler les infections virales.

Dans ce contexte, nous avons pris le parti de développer uniquement les principales voies de la réponse immunitaire (RI) retrouvées chez l'ensemble des chiroptères, accompagnés des résultats connus jusqu'alors.

Avec l'arrivée du séquençage à haut débit, plus de 500 gènes impliqués dans la RI innée et adaptative ont été décelés chez la roussette noire (*P. alecto*) (Papenfuss *et al.*, 2012). Les recherches seront certainement encore longues avant de comprendre en quoi les mécanismes de la RI chez les chiroptères diffèrent des autres mammifères et semblent plus efficaces.

II. B.3.1. L'aptitude à ne pas développer de symptômes

" Peut-être que l'aspect le plus intéressant de l'étude des infections virales naturelles et expérimentales des chauves-souris est l'absence de réponse de l'hôte à l'infection établie." En 1974, l'observation de Sulkin sur les infections virales chez les chiroptères récapitule *in extenso* la situation : la plupart des chiroptères infectés par des virus ne présentent aucun symptôme associé. C'est l'aspect essentiel de leur rôle en tant que réservoir de pathogènes (Sulkin et Allen, 1974). Cette observation a été vérifiée pour de nombreux virus zoonotiques, comme les lyssavirus (ex : le virus de la rage), les filovirus (Ebola, virus Marburg), les flavivirus (virus de l'encéphalite japonaise, JEV), les coronavirus (SRAS-CoV), les hénipavirus (virus Hendra, Nipah) (George *et al.*, 2011; Leroy *et al.*, 2005; Swanepoel, 2007; Jones *et al.*, 2015; Wild, 2009).

Selon Wang, l'adaptation du système immunitaire des chiroptères en réponse à une infection virale proviendrait de la longue co-évolution entre ces hôtes et les virus (Wang et Cowled, 2015). Brook et Dobson poussent le raisonnement plus loin, en émettant l'hypothèse que chez les chiroptères, la réponse immunitaire innée serait capable de rapidement diminuer la

réplication virale à des niveaux très bas, sans pour autant l'éliminer, de manière à en limiter l'effet immunopathologique chez ces hôtes (Brook et Dobson, 2015).

II. B.3.2. La présence de l'immunité innée

Des preuves de la présence des molécules impliquées dans la reconnaissance de virus et la cascade de signalisation de la réaction immunitaire innée ont récemment été apportées (figure 15).

II. B.3.2. a. La détection du virus par l'hôte

Grâce à l'avancée du séquençage, l'analyse des génomes de chiroptères a permis de caractériser la présence de PRRs (Pattern Recognition Receptors), récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes (PAMPs), dont des virus. Les mécanismes semblent similaires à ceux retrouvés chez l'ensemble des mammifères. Deux familles de récepteurs, membranaires et cytotogiques, jouent un rôle de la reconnaissance de l'infection virale (figure 15 (1)) et activent la réponse immunitaire innée, première ligne de défense contre l'infection :

(i) Des récepteurs membranaires de type Toll (en anglais Toll-Like receptors, TLRs), ont été caractérisés chez trois espèces de chiroptères appartenant à trois familles (*Vespertilionidae*, *Pteropodidae*, *Phyllostomidae*), notamment les TLR3, TLR7 et TLR8, qui reconnaissent les particules virales (Iha *et al.*, 2010; Cowled *et al.*, 2011; Escalera-Zamudio *et al.*, 2015). Ces protéines sont bien conservées et l'expression de gènes en amont est fortement régulée (Cowled *et al.*, 2011). Elles présentent également des sites spécifiques retrouvés chez les chiroptères seulement, et qui seraient le résultat d'une pression de sélection positive due à

l'interaction à long terme entre les hôtes et des pathogènes spécifiques à ces hôtes (Escalera-Zamudio *et al.*, 2015).

(ii) Des récepteurs cytosoliques de type RIG-I (pour Retinoacid Inductible Gene-Like Receptors) qui reconnaissent l'ARN viral intracellulaire, ont été caractérisés chez la roussette et des rhinolophes (*Pteropus alecto*, *Rhinolophus* sp.) (Cowled *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015).

Si l'activité des protéines correspondantes n'a pas encore pu être mise en évidence *in vivo* ou sur culture de cellules chiroptères, leur présence dans le transcriptome signifie que ces hôtes utilisent ce système de défense immunitaire.

II. B.3.2.b. *La transduction du signal et activation des défenses immunitaires*

La détection d'un virus entraîne la production d'interférons (INFs) qui enclenchent une cascade de signalisation cellulaire (figure 15 (2)). Plusieurs types d'interférons sont présents chez les chiroptères :

-Les INFs de type I (INF- α et INF- β) sont sécrétés par de nombreuses cellules, après la détection de virus via les récepteurs RIG-I. Ils participent au recrutement des macrophages et des cellules tueuses (appelées NK, pour Natural Killer) qui vont agir contre les infections virales et les cellules tumorales (Sulkin et Allen, 1974; Chawla-Sarkar *et al.*, 2003). De la même manière que chez les autres mammifères, la production d'INFs de type I nécessite l'intervention de la protéine MAVS transmembranaire, localisée sur la surface externe mitochondries (Yoneyama et Fujita, 2009).

- Les INFs de type II (INFs- γ) ont été les premiers à être mis en évidence dans l'immunité des chiroptères (Sulkin et Allen, 1974). Janardhana a mis en évidence *in vitro* le rôle des INFs- γ dans la réponse antivirale des cellules de roussettes (*Pteropus alecto*) à l'infection par le virus

Hendra, alors qu'au contraire, l'infection de ces mêmes cellules par le virus Nipah inhibe leur production (Janardhana *et al.*, 2012).

- Des INFs de type III (INFs λ) sont identifiés chez deux espèces de chiroptères insectivore (*Myotis luncifugus*) et frugivore (*Pteropus alecto*) (Fox *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011). Les récepteurs correspondants sont exprimés dans de nombreux tissus, contrairement aux récepteurs humains et murins où l'expression varie selon les organes. Ceci laisse supposer le rôle prépondérant et plus large des INFs de type III dans l'activité antivirale chez les chiroptères (Zhou *et al.*, 2011).

La cascade de signalisation cellulaire des INFs entraîne l'activation des protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Le complexe de protéines STAT1 a été caractérisé chez une roussette seulement (*Rousettus aegyptiacus*) (Fujii *et al.*, 2010). Ces facteurs de transcription stimulent l'expression des gènes codant les protéines qui inhibent la réplication virale (figure 15 (3, 4)). Cependant, les virus de la rage et les hénipavirus inhibent cette voie (Rodriguez et Horvath 2004; Brzózka, Finke, et Conzelmann 2006).

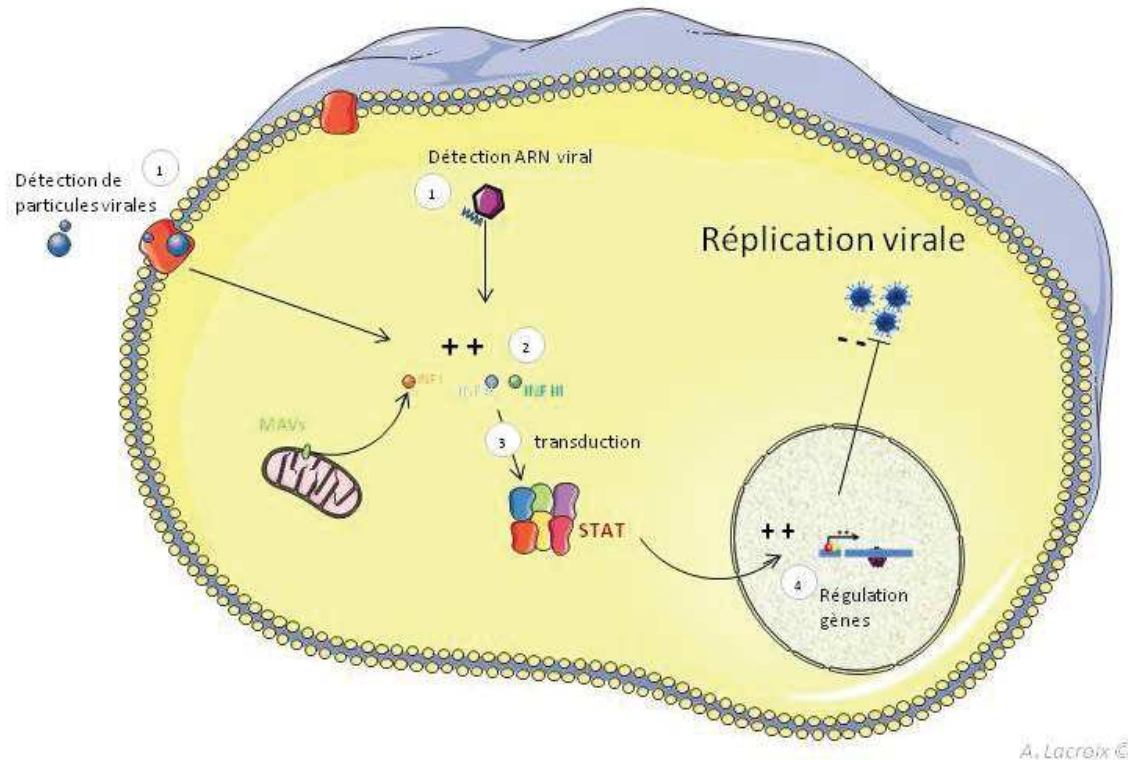


Figure 15 : Schéma simplifié des mécanismes de la réponse immunitaire innée, identifiés chez les chiroptères. La détection d'une infection virale par des récepteurs membranaires (TLR) ou cytotogiques (PRR), entraîne la production d'INFS (2) qui vont intervenir dans la transduction cellulaire du signal (3). La production d'INF I fait intervenir les protéines situées à la surface des mitochondries (MAVs). La transduction du signal active le complexe protéique STAT, constitué de facteurs de transcription qui vont migrer dans le noyau de la cellule infectée et activer la transcription de gène codant des protéines qui inhibent la réplication virale (4). Ces étapes de la RI innée sont contrecarrées par certains virus.

Zhou a démontré que chez la roussette noire (*P. alecto*), le gène codant l'INF- α est exprimé continuellement par des cellules primaires de rein, même sans la présence d'infection virale. Ceci pourrait expliquer la capacité des chiroptères à survivre à des infections virales, pourtant létales chez d'autres mammifères (Zhou *et al.*, 2016).

Cependant, la capacité de certains virus à inhiber la production d'INFs ou la transduction du signal infectieux, souligne le fait que d'autres voies de défense immunitaire existent chez les chiroptères. C'est le cas lors d'une infection par les hénipavirus qui bloquent

la signalisation des INFs- λ , alors que l'hôte infecté ne développe aucun symptôme (Rodriguez et Horvath 2004).

II. B.3.3. le complexe du complément

Le complexe du complément est un complexe de protéines présent dans le sérum et impliqué dans les mécanismes d'élimination des pathogènes en stimulant l'inflammation, l'opsonisation et la destruction par lyse ou phagocytose des cellules infectées (Abbas *et al.*, 2014). Il fait partie de l'immunité innée, même si son fonctionnement est en collaboration avec l'immunité acquise.

Le complexe du complément est activé par plusieurs voies biochimiques, dites "classiques", comme la voie des lectines (reconnaissance des micro-organismes) ou des complexes immuns (reconnaissance des anticorps, qui fait intervenir indirectement la réponse immunitaire adaptative), mais également par une voie "alterne" par les virus ou bactéries. Chez les chiroptères, la voie alterne est très développée. L'opsonisation et la destruction de la cible par lyse osmotique sont les voies d'action privilégiées, plus que l'utilisation de cellules dendritiques ou de phagocytes (Hatten *et al.*, 1973).

Chez les espèces hibernantes, cette activité reste stable quelque soit la température, contrairement à d'autres mammifères ou espèces chiroptères non hibernantes (Hatten *et al.*, 1973). Cette voie de défense semble maintenue pendant les périodes d'hibernation, et donc être importante pour le système de défense des chiroptères (Allen *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2013). Les mécanismes intimes de cette voie de défense sont cependant loin d'être élucidés et généralisables, car ils semblent très spécifiques à chaque espèce et évoluer en fonction de l'environnement (Baker *et al.*, 2013).

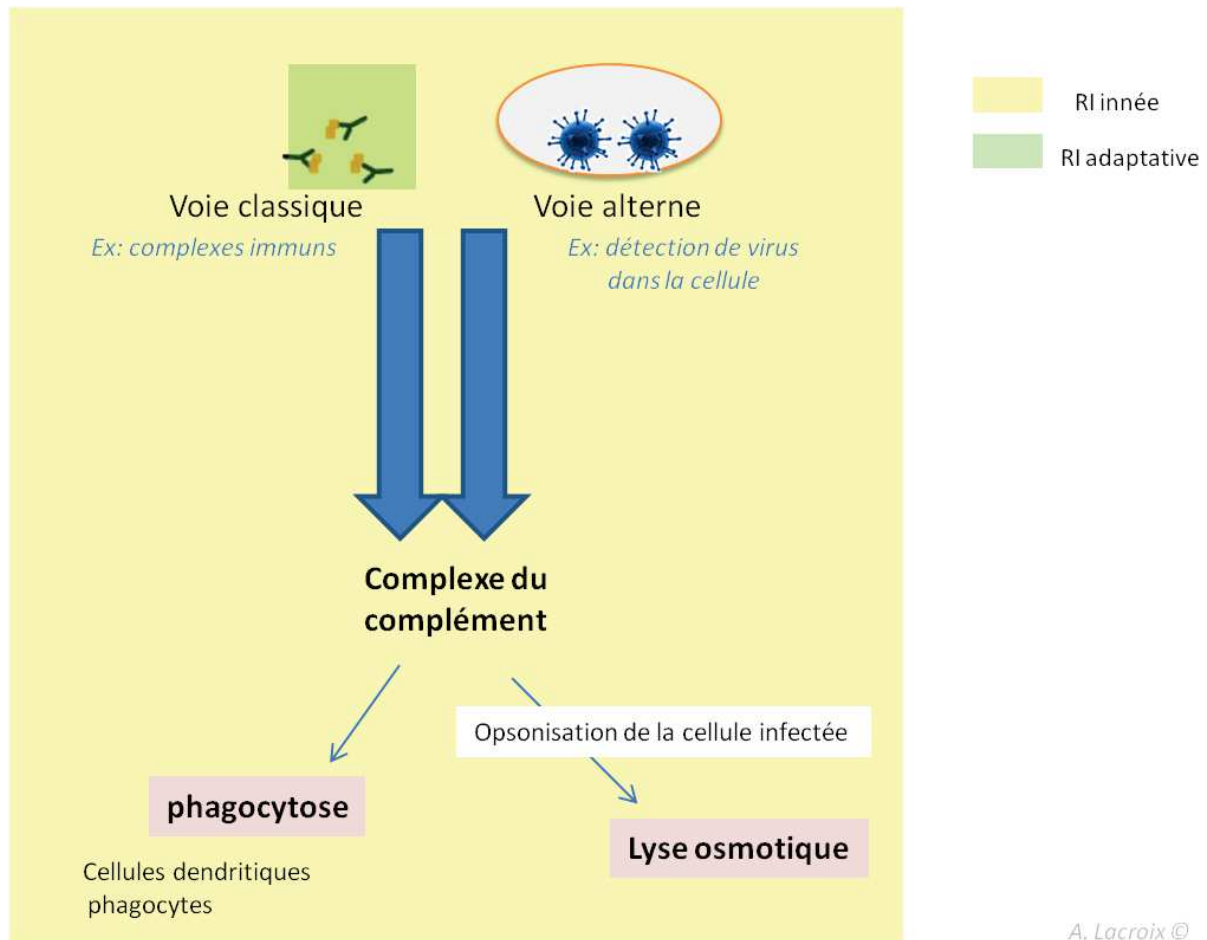


Figure 16 : Schéma simplifié du mode d'action du complexe du complément dans la réponse immunitaire (RI).

II. B.3.3. La présence de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative permet une protection spécifique et à long terme des chiroptères. Deux types de lymphocytes sont impliqués dans cette réponse : les lymphocytes B qui sécrètent les anticorps (RI à médiation humorale) et les lymphocytes T qui détruisent les cellules infectées (RI à médiation cellulaire) et coordonnent la RI adaptative. Les études ont mis en évidence la présence de l'immunité adaptative à médiation cellulaire et humorale chez les chiroptères, avec des variations quantitative et qualitative en fonction des espèces mais aussi de l'environnement (Allen *et al.*, 2008).

II. B.3.3.a. Réponse immunitaire à médiation humorale

La détection d'anticorps neutralisants contre les virus Hendra, Ebola, et SRAS-Like CoV chez des chiroptères piégés dans leur milieu naturel, prouve que les chiroptères sont capables de réponse immunitaire à médiation humorale (Halpin *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2005). La réponse immunitaire à médiation humorale met en jeu les fonctions de neutralisation, précipitation, hémagglutination, opsonisation, cytotoxicité cellulaire ainsi que l'activation du complément via la voie classique, pour contrôler une infection (Brook et Dobson, 2015). La figure 17 résume le mode d'action de la RI à médiation humorale.

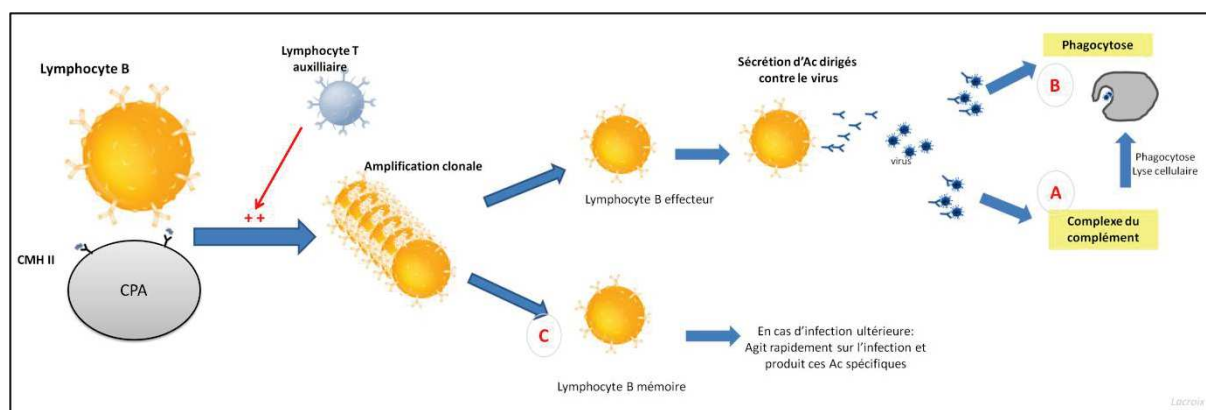


Figure 17 : Schéma simplifié de la réponse immunitaire à médiation humorale. Les lymphocytes B sécrètent des immunoglobulines (Ig) appelés anticorps qui se lient spécifiquement à un ou plusieurs antigènes. Cette liaison active la phagocytose de l'agent pathogène ou la destruction de la cellule infectée par l'activation du complexe du complément (A). La liaison anticorps-antigène permet ensuite le recrutement de lymphocytes T auxiliaires qui activent la prolifération clonale des lymphocytes B. ceux-ci se différencient en (i) plasmocytes producteurs d'anticorps (spécifiques à l'antigène), ce qui permet d'amplifier la réponse immunitaire spécifique (B), ou (ii) en lymphocytes B mémoire (C). Ces derniers assurent une réponse ciblée et plus efficace en cas d'infection ultérieure par le même pathogène.

Butler a montré que le nombre de classes d'immunoglobulines (Ig) dépendrait de l'espèce de chiroptère. Il détecte la présence des 5 gènes codant les 5 classes d'Ig, présentes chez les mammifères (IgM, IgG, IgA, IgE et IgD) chez le vespertilion brun (*M. lucifugus*),

mais seulement 4 chez le cynoptère, chiroptère frugivore (*Cynopterus sphinx*) (Butler *et al.*, 2011). Les IgM, IgG, IgA interviennent dans la voie alterne de l'activation du complément. L'absence de l'isotype Ig D chez les ptéropodidés n'est pas encore clairement expliquée. Elle pourrait être due à la perte de cet isotype au cours de l'évolution ou tout simplement aux limites techniques de détection de l'IgD en laboratoire.

Les premières expériences de vaccination ou d'infection expérimentale des chiroptères ont permis de suivre l'évolution de la réponse humorale. Il semblerait que l'ampleur, la vitesse et la durée de la réaction immunitaire humorale primaire serait plus faible que chez d'autres mammifères (lapins, cochons d'inde), et la réponse immunitaire secondaire serait quasi inexistante (Sulkin et Allen, 1974; Sulkin *et al.*, 1966; Chakraborty et Chakravarty, 1984; Sétien *et al.*, 1998). La RI est aussi dépendante des conditions environnementales. Sulkin a prouvé expérimentalement que, dans des conditions d'hibernation, la réponse humorale n'était pas déclenchée après l'infection par le JEV chez la grande chauve-souris brune (*Eptesicus fuscus*). Les premiers anticorps sont détectés 8 jours après la disparition des symptômes (Sulkin *et al.*, 1966).

II. B.3.3.b. La réponse immunitaire à médiation cellulaire

Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) ont à leur surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui assurent la présentation de l'antigène aux lymphocytes T, et les activent (figure 18, A). Les molécules du CMH peuvent être de classe I (CMH I) et être reconnues par les lymphocytes T CD8+, ou de classe II (CMH II) et reconnues par les lymphocytes T CD4+. Une fois activés, les lymphocytes T (L.T) se multiplient de manière clonale et se différencient comme suit :

(i) en L.T mémoire, capables de reconnaître le même pathogène lors d'une prochaine infection et d'intervenir de manière plus efficace (figure 18, B).

(ii) en L.T effecteurs (figure 18, C1 et C2): soit L.T auxiliaires appelés aussi L.T. helpers (Th) (issus de la différenciation des clones de L.T CD4+) ou L.T cytotoxiques (issus de la différenciation des clones de L.T CD8+). Ces derniers sont capables de détruire les cellules infectées par un pathogène, tandis que les L.T auxiliaires agissent dans la régulation de l'ensemble de la réponse immunitaire adaptative, par le biais de cytokines.

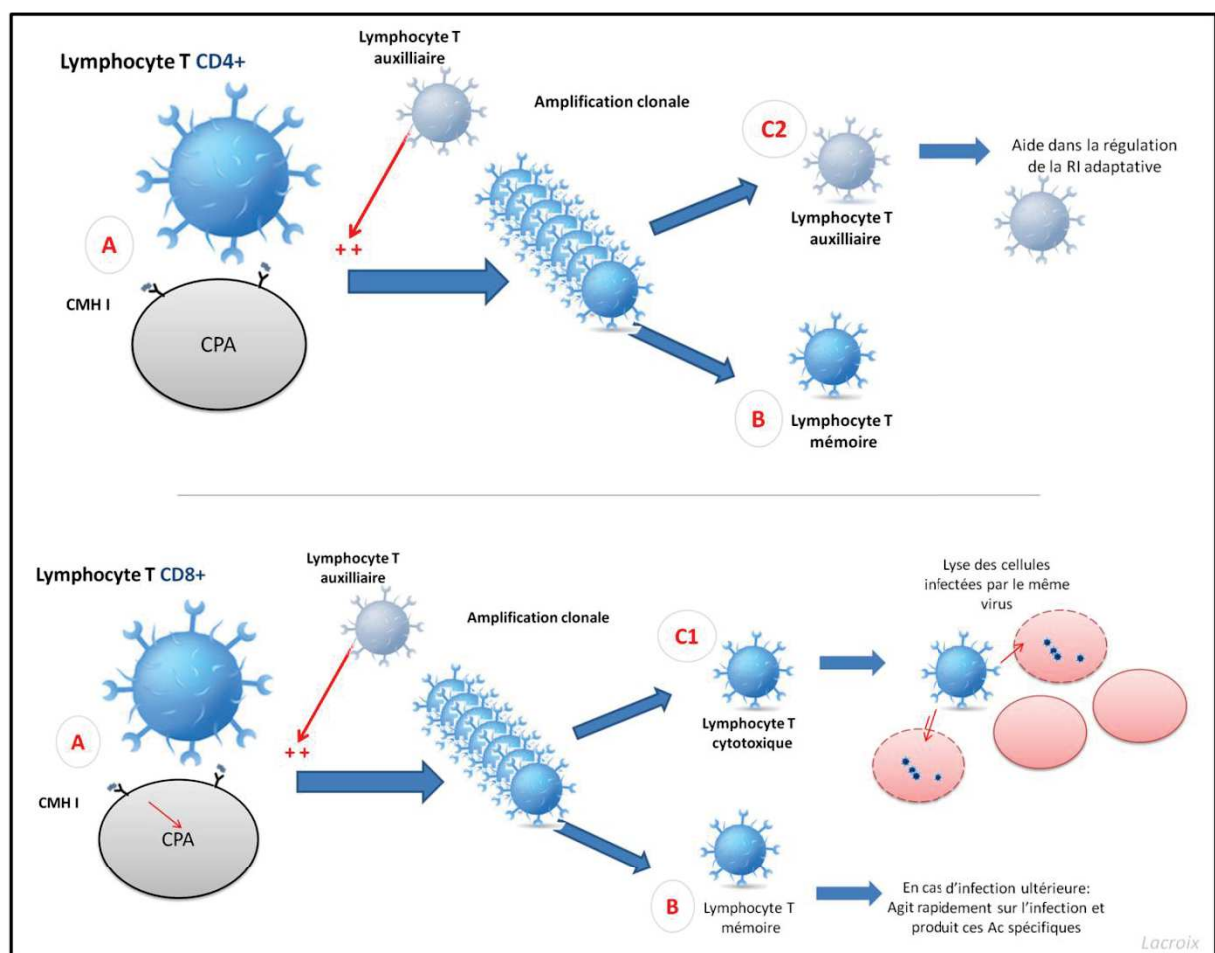


Figure 18 : Schéma simplifié de la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Le manque de réactifs adaptés explique pour l'instant qu'il soit impossible de reconnaître les différents types de lymphocytes T, ce qui empêche d'examiner la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez les chiroptères (Baker *et al.*, 2013).

II. B.3.3.c. *Des preuves de la présence de cellules immunocompétentes*

McMurray et Thomas (1979) ont apporté la preuve *in vitro* que des L.T interviendraient chez *Desmodus rotundus* et *Carollia perspicillata* en réponse à une infection par un ascomycète (*Histoplasma capsulatum*). Chakraborty et Chakravarty (1983) ont mis en évidence la présence d'une RI à médiation cellulaire chez *Pteropus giganteus*, et la présence supposée de L. T et L. B. En 1991, Sarkar et Chakravarty ont visualisé pour la première fois des cellules de type dendritiques, connues pour leur rôle de CPA dans l'activation des lymphocytes (Sarkar et Chakravarty, 1991).

II. B.3.3.d. *Des preuves de l'existence des molécules de signalisation*

Les analyses *in silico* ont permis de détecter la présence des gènes codant les protéines du CMH II chez plusieurs espèces de microchiroptères (genres *Saccopteryx*, *Carollia* et *Noctilio*) (Mayer et Brunner, 2007; Schad *et al.*, 2011), ainsi que des molécules du CMH I dans le transcriptome de la roussette (*P. alecto*) (Papenfuss *et al.*, 2012). Le gène de la glycoprotéine CD4 a été détecté chez une roussette (*Rousettus aegyptiacus*) (Omatsu *et al.*, 2006). Si la présence de lymphocytes T auxiliaires n'a pas encore été démontrée, de nombreuses cytokines jouant un rôle dans leur recrutement et leur activation ont été répertoriées chez les chiroptères. C'est le cas des interleukines (IL)12 et INF-gamma qui activeraient les Th2, ou encore les IL-6 et IL-23 qui activeraient les Th17 (Iha *et al.*, 2009).

II. B.3.3.e. *Un délai dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire*

D'après les études effectuées, la RI à médiation cellulaire est plus longue à mettre en place chez les chiroptères que chez d'autres mammifères (McMurray et Thomas, 1979; Chakraborty et Chakravarty, 1983; Paul et Chakravarty, 1986; Chakravarty et Paul, 1987). Ceci suggère que d'autres mécanismes interviennent pour contrôler l'infection chez cet hôte et lui permettre de ne pas développer de symptômes. A ce jour, les mécanismes intimes et les spécificités de la RI à médiation cellulaire chez les chiroptères ne sont pas connus.

Selon L. Wang, l'aptitude des virus à ne pas déclencher les voies de signalisation usuelles lors de l'infection, résulterait de la longue co-évolution entre les virus et leurs hôtes, (Wang *et al.*, 2011). Chez les virus à ARN, le génome présente une fréquence élevée de mutations et un haut potentiel de recombinaison, ce qui aurait favorisé la capacité d'adaptation à leurs hôtes chiroptères au cours de l'évolution (Alcami et Koszinowski, 2000; Holmes, 2009; Wang *et al.*, 2011).

III. Les astrovirus

III. A. Généralités sur le virus

Les astrovirus (astVs) sont des virus à ARN simple brin de polarité positive (ARN+). Ces virus n'ont pas d'enveloppe et mesurent 28 à 30 nm de diamètre. Ils présentent une capsidie icosaédrique qui leur confère une morphologie en étoile, visible en microscopie électronique (figure 19). Cette morphologie caractéristique est à l'origine de son nom astrovirus, du grec *astron*, qui signifie étoile. Ils forment la famille des *Astroviridae*.

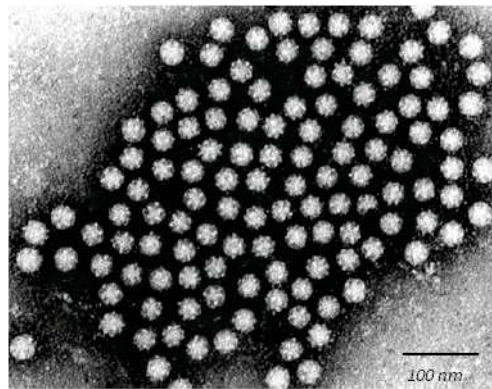


Figure 19 : Astrovirus en microscopie électronique. On distingue la morphologie caractéristique en étoile des virions (crédit photo : E. Bohl et L. J. Saif).

Les astrovirus sont présents sur tous les continents et infectent de nombreuses espèces. Ils sont divisés en deux principaux genres : les *Avastrovirus* (AvAstVs), présents chez les espèces aviaires, et les *Mamastrovirus* (MAstVs), infectant de nombreux mammifères, dont l'Homme. Ils infectent les cellules de l'intestin grêle et sont responsables de troubles intestinaux et de gastro-entérites chez leurs hôtes.

Ils se transmettent par voie oro-fécale, par contact entre individus ou par l'intermédiaire d'objets, d'aliments ou d'eau contaminés. Chez l'Homme, les astrovirus constituent, avec les norovirus et les rotavirus, les agents étiologiques principaux de gastro-entérite (Huraux, 2003).

Les infections à astrovirus peuvent survenir à tout âge, et touchent essentiellement les enfants et les personnes immunodéprimées. Les astrovirus sont notamment responsables d'un tiers des épidémies de gastro-entérite virale chez les enfants.

La période d'incubation de 3 à 4 jours, est suivie d'une phase symptomatique de 3 à 5 jours avec comme symptômes fréquents : nausées, crampes intestinales, fièvre, diarrhées, vomissements (Meliopoulos et Schultz-Cherry, 2012). Les gastro-entérites aiguës les plus sévères peuvent conduire à une déshydratation sévère nécessitant une prise en charge rapide. Elles peuvent être fatales chez les individus à risque, exposés à une malnutrition et/ou à des conditions climatiques difficiles.

Les signes cliniques étant peu spécifiques, la distinction entre rotavirose et astrovirose est difficile et repose sur le caractère aigu/subaigu de l'infection.

Les astrovirus chez l'Homme sont regroupés en trois clades distincts selon la classification actuelle (figure 20) :

- Les souches Human-AstV (HAstV, groupe 1 sur l'arbre) comprennent huit sérotypes (HastV 1 à 8). Le sérotype 1 est le plus fréquent (70% des infections à astrovirus), les sérotypes 2, 3, 4 et 5 représentent chacun 6 à 8% des infections. Les sérotypes 6, 7 et 8 sont plus rares. L'immunité développée après une infection par un sérotype donné protégerait l'individu contre celui-ci à vie. Toutefois, étant donné l'absence d'immunité croisée, des infections par d'autres sérotypes peuvent provoquer de nouveaux épisodes de gastro-entérite à l'âge adulte. En France, 50% des enfants de 5 à 12 mois présentent des anticorps contre des astrovirus de sérotype 1 (Huraux, 2003).

Des phénomènes de recombinaisons entre des sérotypes au cours de co-infections ont d'ailleurs déjà été rapportés (Walter *et al.*, 2001; Wolfaardt *et al.*, 2011).

- Les souches AstV-MLB1 et AstV-MLB2 (groupe 2 sur l'arbre) sont génétiquement liées à des astrovirus isolés chez des rats et des porcs (Chu *et al.*, 2010; Shan *et al.*, 2011).
- Les souches AstV-A1 et AstV-A2 font partie du groupe HMO (abréviation de "Human, Mink, Ovine") et sont génétiquement proches des souches d'astrovirus isolées chez des visons et des caprins.

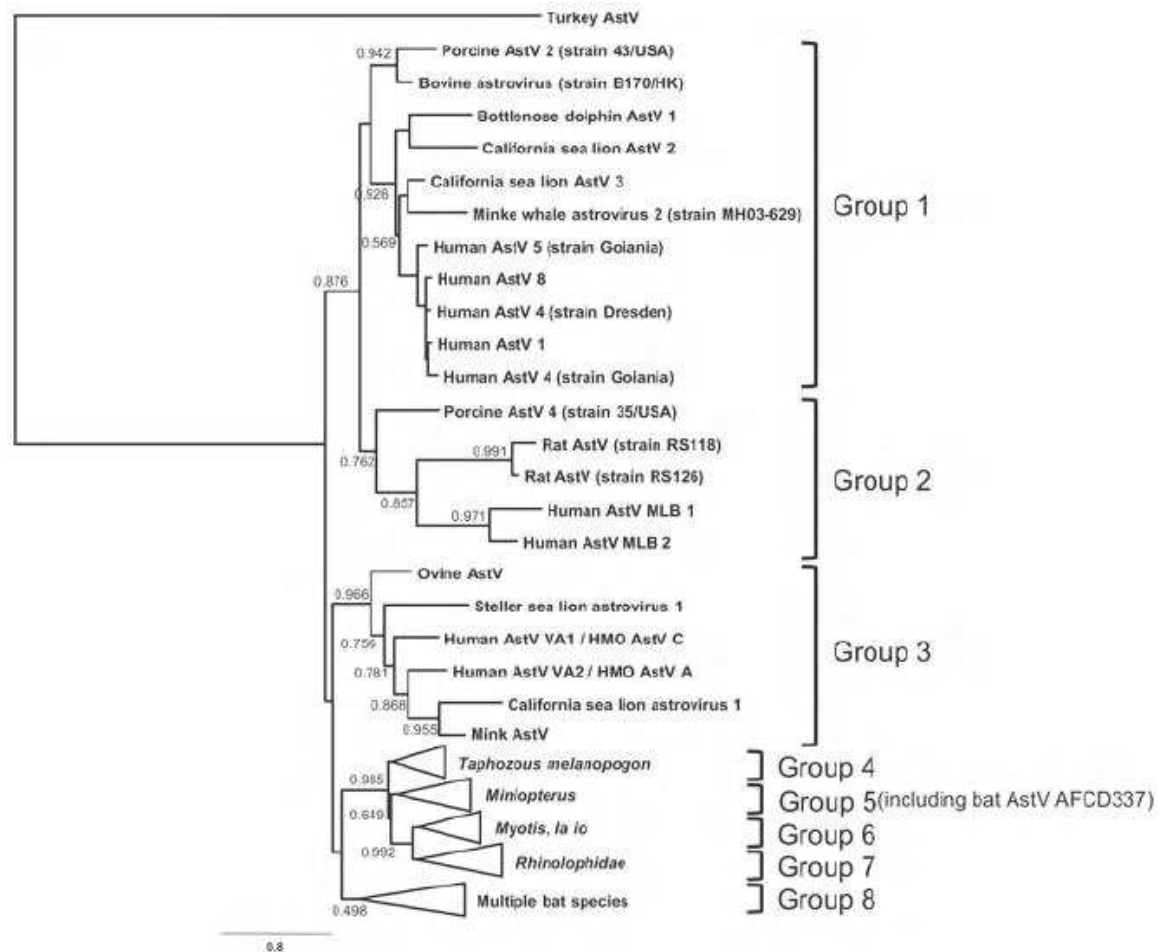


Figure 20 : Classification simplifiée des astrovirus de mammifères. Analyse phylogénétique basée sur une portion du gène de la RdRp (422 nt), en utilisant un modèle de Maximum de vraisemblance. L'arbre obtenu est raciné par un astrovirus aviaire. Huit groupes d'astrovirus se distinguent: les astrovirus humains se répartissent dans les 3 premiers groupes tandis que les astrovirus détectés chez les chiroptères forment des groupes monophylétiques 4, 5, 6, 7 et 8 (d'après Finkbeiner et Holtz, 2012; Guix *et al.*, 2012).

III. B. Génome et cycle de réplication des Mamastrovirus

III. B.1. Composition du génome

La taille du génome varie entre 6,17kb (astVs humains de souche MLB) et 7,7 kb (AvAstV) selon les astrovirus (De Benedictis *et al.*, 2011). Le génome viral est constitué de 3 cadres ouverts de lecture, ou Open Reading Frame en anglais (ORFs) : les ORF1a et ORF1b codent les protéines non structurales, et l'ORF2 code les protéines structurales. Il possède également des régions non traduites (UTR) aux extrémités 3' et 5' du génome (figure 21).

- L'ORF1a est composé d'environ 2 800 nucléotides (nt) et code un polypeptide d'environ 900 acides aminés (aa) qui sera clivé en quatre protéines, dont une protéase (figure 21). Aucune région codant l'hélicase n'a, à l'heure actuelle, été identifiée dans le génome des *Astroviridae*, ce qui est rare chez les virus à ARN simple brin de taille supérieure à 6 000 nt. L'hélicase joue, en effet, un rôle important dans la réplication du génome (Méndez *et al.*, 2012). Une région en amont de la protéase codant pour 6 motifs transmembranaires qui présentent des sites de liaison et de catalyse similaires à ceux retrouvés chez l'hélicase, existe néanmoins. Deux autres protéines peu caractérisées sont également codées par l'ORF1b : (i) une superhélice à l'extrémité N terminale et (ii) une phosphoprotéine hypervariable ressemblant fortement aux protéines VPg des *calicivirus*, jouant un rôle essentiel d'amorce dans la réplication du génome viral, ainsi que dans l'initiation de la traduction du génome répliqué (Daughenbaugh, 2005).

- L'ORF1b est constitué d'environ 1 500 nt et contient le gène de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). Cette protéine prend en charge la réplication du virus à partir du brin d'ARN viral.

- Un chevauchement de 10 à 148 nt entre les ORF1a et ORF1b permet un décalage de phase nécessaire à la traduction de l'ORF1b en RdRp. Un chevauchement supplémentaire entre l'ORF1b et l'ORF2 est observé chez les astrovirus de mammifères.
- L'ORF2 fait environ 2 500 nt et code pour trois protéines (VP34, VP27 et VP25 chez les astrovirus humains) qui constituent la capside du virus.

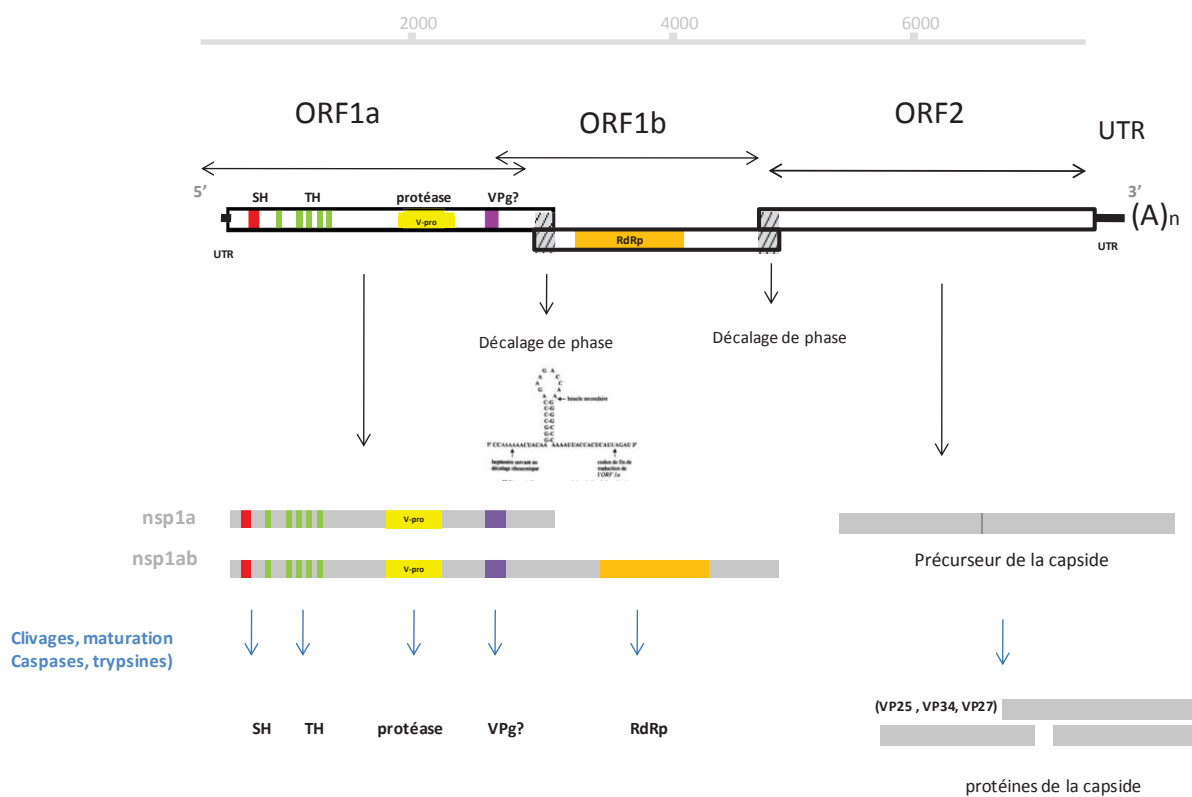


Figure 21 : Schéma d'un génome d'astrovirus humain et des principales protéines. L'ORF1a code cinq protéines. Une sérine protéase (~27 KDa, **V-pro**) qui joue un rôle dans le clivage polypeptides viraux, une protéine transmembranaire ayant des motifs similaires à l'hélicase (**TH**), une ARN polymérase ARN dépendante (**RdRp**, ~57KDa) au niveau de l'ORF1b qui permet la réplication du génome viral. Les deux protéines de superhélice (**SH**, 20KDa) et la potentielle protéine **VPg** (21-27 KDa) joueraient un rôle dans la régulation de réplication du génome viral, et par conséquent dans le potentiel infectieux du virus. La VPg interviendrait également dans la traduction des ARN génomiques et subgénomiques, mais le mécanisme reste toutefois à clarifier. Les portions hachurées représentent les décalages de phase détectés. L'ORF2 code pour les protéines de la capside (87-90 KDa), il est traduit à partir de l'ARN subgénomique. Chez l'Homme, 3 protéines sont générées VP34 : domaine conservé, VP25 et VP27 : protéines de spicule.

Des analyses de séquences entre astrovirus issus d'hôtes différents montrent une variabilité importante entre les protéines structurales et non structurales. Ainsi, la séquence d'acides aminés codant pour la RdRp peut présenter jusqu'à 25 % de différence entre diverses souches d'astVs humains du même groupe (HAstV-VA1 et HAstV-VA2, par exemple) (Schultz-Cherry, 2012).

La longueur des ORFs varie également selon les astrovirus en raison des phénomènes d'insertions/délétions (in/del). La taille de l'ORF1a est la plus variable du fait de la présence plus fréquente d'in/del près de l'extrémité 3'. L'ORF1b qui code la RdRp est la région la plus conservée du génome. Même si l'ORF2 ne varie pas autant que l'ORF1a en longueur, cette portion du génome présente la plus grande variabilité de séquence nucléotidique d'un virus à l'autre. La portion codant la protéine VP34, principal composant de la coque de la capside, reste assez conservée, tandis que les régions codant les protéines VP25 et VP27, en interaction avec les récepteurs des cellules hôtes, présentent de très fortes variabilités.

III.B.2. Cycle de réplication

La culture *in vitro* des astrovirus humains et de certaines souches animales a permis de comprendre et de caractériser le cycle de réplication des astrovirus, bien que de nombreuses étapes nécessitent encore d'être clarifiées. Les astrovirus spécifiques aux chiroptères n'ayant encore pas pu être cultivés, la description du cycle de réplication ci-dessous s'applique aux Mamastrovirus en général (figure 22).

Le cycle de réplication présente de nombreuses similitudes avec ceux des familles *Caliciviridae* et *Picornaviridae*. Les astrovirus possèdent cependant des caractéristiques de

cycle biologique uniques, comme le processus de clivage protéolytique des particules virales par les caspases cellulaires, nécessaire à la maturation et à la sortie des virions (Méndez *et al.*, 2012).

III. B.2.1 Entrée du virus dans la cellule

L'entrée du virus dans la cellule hôte se fait par endocytose clathrine-dépendante. Les mécanismes précis de l'entrée sont assez méconnus, mais nécessitent l'intervention de trypsine extracellulaire. Celle-ci clive les protéines VP25 et VP27 et induit des changements de conformation qui rendent le virus infectieux. Lorsque le virus interagit avec les récepteurs cellulaires, la perméabilité de la cellule augmente (Moser, Carter et Schultz-Cherry 2007). Cette interaction active également des voies de signalisation cellulaire ERK/MAP kinase qui jouent un rôle important dans l'efficacité de l'infection virale, même si les mécanismes sont encore méconnus.

III. B.2.2. Multiplication du virus

Une fois le virus internalisé et l'endosome mûré, les éléments du virus sont relargués dans le cytoplasme. L'ARN viral, de polarité positive (ARN⁺), est traité comme un ARN messager par la cellule hôte : il est directement traduit par la machinerie cellulaire en précurseur polyprotéique.

Deux précurseurs de protéines non structurales sont générés : les nspl_a et nspl_b (figure 22). Des protéases cellulaires et virales les clivent en 5 protéines nécessaires à la réplication du génome viral et l'assemblage des virions.

L'ARN⁺ génomique est ensuite répliqué par l'ARN polymérase nouvellement synthétisée en une molécule d'ARN à polarité négative (ARN⁻) qui servira de matrice pour la synthèse de

nouveaux génomes viraux et d'ARN subgénomiques + (ORF2). Le précurseur de la capsid (VP90) est traduit à partir de cet ARN subgénomique.

La réplication et l'assemblage des virus à ARN⁺ fait intervenir les membranes cellulaires de l'hôte (Miller et Krijnse-Locker 2008; Denison 2008; Novoa *et al.* 2005). L'infection par ces virus engendre un réarrangement intracellulaire des membranes pour former un réseau de vésicules à simple ou double membrane, formant des invaginations ou sphérules associées à la synthèse de l'ARN viral et des protéines, ainsi qu'à l'assemblage de particules virales. Le complexe de réplication est formé par des membranes dérivées du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi, des lysosomes, des endosomes, de l'ARN viral ainsi que des protéines virales et cellulaires impliquées dans ces processus.

III. B.2.3. Assemblage et sortie des virions

A la fin du cycle de réplication, la polyprotéine VP90, synthétisée à partir de l'ORF2, est dissociée des particules membranaires. Elle est clivée dans le cytosol par des capsases au niveau de l'extrémité C' générant une nouvelle préprotéine plus courte VP70 (70-79 KDa), qui est nécessaire pour la sortie des virions immatures de la cellule. La sortie des virions fait intervenir des caspases intracellulaires de l'hôte, dont le mode d'action reste encore peu connu (Méndez *et al.*, 2012). Des trypsines extracellulaires clivent VP70 en trois protéines (VP34, VP27 et VP25), qui composeront la capsid virale. A la suite de cette maturation extracellulaire, le virus devient infectieux (Bass et Qiu, 2000). La protéine VP34 à l'extrémité N', est la partie la plus conservée de la capsid, tandis que les protéines VP25 (27-29 KDa) et VP27 (25-26 KDa) contiennent des domaines variables. Ces motifs se fixent aux récepteurs des cellules hôtes dans les premières phases de l'infection et possèdent les déterminants antigéniques (Sanchez-Fauquier *et al.* 1994; Bass et Qiu 2000; Méndez *et al.* 2002).

In vitro, des altérations et lyse des cellules ont été observées sur des lignées cellulaires infectées (Meliopoulos et Schultz-Cherry 2012). L'infection par des astrovirus aviaires peut engendrer une nécrose des cellules hépatiques chez certaines espèces aviaires (Gough *et al.*, 1985). Cependant, les connaissances actuelles ne permettent pas de déterminer si l'infection par les astrovirus conduit à un processus lytique ou non de la cellule infectée.

La production de virions commence entre 8 et 12 heures après l'infection. Au bout de 24 heures, 30 à 50% des virus produits sont excrétés par les cellules infectées.

III. B.3. Des connaissances lacunaires sur l'entrée dans les cellules et la capacité d'infection des astrovirus

Le cycle cellulaire des astVs a été décrypté sur la base des observations *in vitro*. L'endocytose clathrine-dépendante semble être la voie utilisée par les astVs dans des cellules Caco-2 (cellules d'adénocarcinome du côlon humain) (Méndez *et al.*, 2014). Mais la compréhension des mécanismes d'entrée cellulaire des astVs *in vivo* reste encore lacunaire.

La disparité des résultats lors des expériences d'infection des lignées cellulaires par différents astrovirus suggère qu'il existerait des différences dans les modalités d'entrée cellulaires (De Benedictis *et al.*, 2011). *In silico*, la cristallographie montre des structures caractéristiques de domaines de liaison à un récepteur cellulaire, "Receptor binding domain" en anglais (RBD) au niveau des protéines de capsid des astVs. Elle montre également des différences dans la morphologie entre les capsides des avastrovirus et des mamastrovirus au niveau de ce site de liaison (Jonassen *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2011; DuBois *et al.*, 2013).

De plus, des hôtes accidentels exposés à des souches sont capables d'induire une réponse immunitaire, prouvant bien le potentiel de transmission limité (Meliopoulos *et al.*, 2014).

Ceci suggère que la connaissance de la configuration des protéines de capside et de la présence de récepteurs cellulaires chez l'hôte potentiel, permettrait de mieux définir le tropisme cellulaire, l'entrée des astVs dans la cellule cible et donc le potentiel de transmission des astVs.

Les investigations *in silico* semblent les plus appropriées pour palier l'impossibilité d'isoler de nombreux mamastVs en culture cellulaire. Cependant, relativement peu de séquences codant les protéines structurales (ORF2) des astVs sont disponibles dans la GenBank. Concernant les astVs de chiroptères, seulement 13 séquences complètes d'ORF2 existent et aucun génome complet d'astV de chiroptère n'est disponible dans la GenBank (NCBI, 2016). Le manque de données limite les analyses *in silico* du potentiel de transmission inter-espèces.

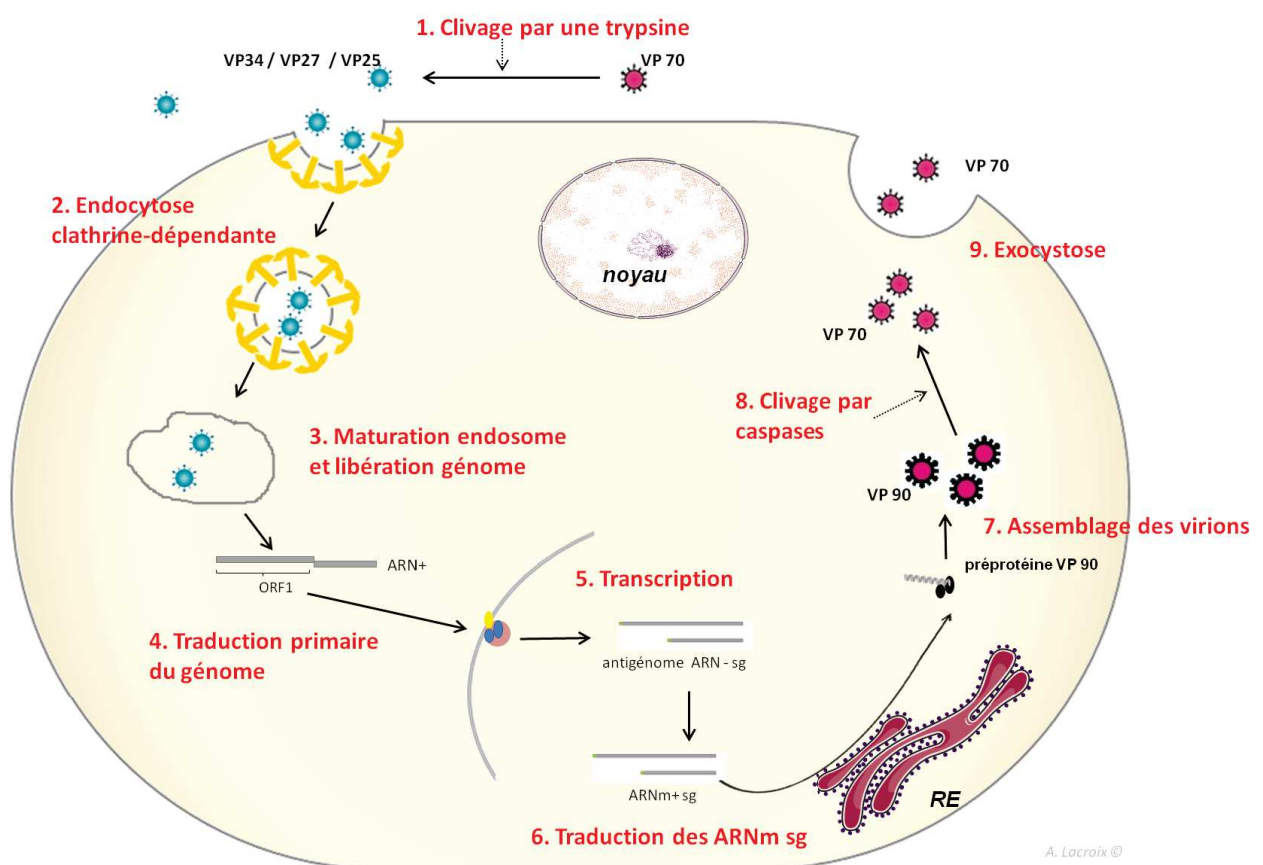


Figure 22 : Cycle de réplication des astrovirus (modifié d'après Mendéz *et al.*). RE : Réticulum endoplasmique, ARN sg : ARN sous-génomique.

III. C. L'évolution de la classification des astrovirus

Les astrovirus ont été décrits pour la première fois en 1975 chez les humains (Appleton et Higgins 1975). Les infections chez d'autres mammifères ont été décrites à partir de la fin des années 1970, sur du bétail présentant des épisodes diarrhéiques. Les symptômes communs à de nombreux autres agents pathogènes (bactéries, parasites, virus, etc.) rendent difficile le diagnostic clinique de l'infection à astrovirus.

L'essor de la biologie moléculaire a considérablement amélioré le diagnostic des infections à astrovirus permettant ainsi la découverte et la classification de nouvelles espèces d'astrovirus chez un large spectre d'espèces aviaires (*Avastrovirus*) et mammifères marins et terrestres (*Mamastrovirus*) (Cattoli, Chu et Peiris 2012).

En 1995, le comité international de taxonomie des virus (ICTV) a officiellement reconnu la distinction entre les astrovirus et la famille des *Picornaviridae* et *Caliciviridae*, pour classer les *Astroviridae* comme une famille à part entière (Murphy *et al.*, 1995). Leur classification se base sur les études sérologiques et sur l'espèce hôte (Table 5). Celle-ci est rapidement bouleversée par la quantité et la diversité d'astrovirus découverts. En effet, au fur et à mesure des découvertes, il a été démontré qu'un hôte pouvait être infecté par plusieurs espèces différentes et que la spécificité d'hôte n'était pas la règle. Une espèce d'astrovirus peut également infecter plusieurs espèces hôtes (Imada *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2008; Atkins *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009). La difficulté d'isoler les virus *in vitro*, en particulier les astrovirus non humains nouvellement découverts, limite les études sérologiques. C'est la raison pour laquelle les critères de classification ont évolué pour se baser sur les distances génétiques de la séquence de la capside.

La nouvelle classification proposée par Bosch en 2010 et qui se base sur le pourcentage de similarité des séquences d'acides aminés des ORF1b et l'ORF2 complètes a

été adopté par l'ICTV lors du 9ème rapport sur la taxonomie des virus. Les astrovirus d'une même espèce présentent un pourcentage de divergence inférieur à 31,2% dans la séquence d'acide aminés du gène de la capsid, alors que deux astrovirus appartiennent à des espèces différentes si cette divergence est supérieure à 37.8% (King *et al.*, 2012).

La liste des hôtes mammifères s'allonge : des astrovirus humains, porcins, caprins, félins, bovins, murins, canins, de rat, vison, de la famille des otariidés et cétacés sont détectés et caractérisés (De Benedictis *et al.*, 2011).

Tableau 5 : Evolution de la classification des astrovirus.

Date	Evolution de la classification	Critères de classification pris en compte	Référence
1991	Les astrovirus (astVs) font partie des familles de <i>picornaviridae</i> et <i>Caliciviridae</i>		
1993	les astrovirus sont différents de la famille des <i>Picornaviridae</i> et des <i>Caliciviridae</i> , ils forment une famille à part entière dans le phylum des virus à ARN	Analyse des protéines et ARN synthétisés par des cellules infectées	(Monroe <i>et al.</i> , 1993)
1995	La famille des <i>Astroviridae</i> est reconnue comme une famille à part entière par l'ICTV (6ème rapport de l'ICTV) Deux genres d'AstV sont définis : les <i>Mamastrovirus</i> et les <i>Avastrovirus</i>	Classification des astrovirus au sein de la famille selon l'espèce hôte et selon les caractéristiques sérologiques	(Monroe <i>et al.</i> , 1995; Murphy <i>et al.</i> , 1995)
1990-2008	- Découverte de nouvelles espèces d'AstV chez un large spectre d'hôtes mammifères et aviaires - Remarquable diversité génétique observée chez les nouveaux AstVs détectés, au sein d'une même espèce hôte	chez les <i>Mamastrovirus</i> , 6 espèces décrites : <i>Bovine astrovirus</i> , <i>Feline astrovirus</i> , <i>Human astrovirus</i> , <i>Mink astrovirus</i> , <i>Ovine astrovirus</i> , <i>Porcine astrovirus</i> et 33 génotypes : de <i>MAstV 1</i> à <i>MAstV 33</i> chez les <i>Avastrovirus</i> , 3 espèces décrites : <i>Chicken astrovirus</i> , <i>Duck astrovirus</i> , et <i>Turkey astrovirus</i> , ainsi que 7 génotypes : de <i>AAstV 1</i> à <i>AAstV 7</i>	
2001	Définition de nouveaux sérotypes chez les astrovirus des espèces aviaires, humaines, caprines, porcines et chiroptères	Les stéréotypes peuvent être définis en fonction du pourcentage de similarité de l'ORF2 entre deux astrovirus (>95% homologie dans la séquence nucléotidique)	(Taylor <i>et al.</i> 2001; Taylor <i>et al.</i> 2001; Koci, Seal et Schultz-Cherry 2000; Reuter <i>et al.</i> 2012; Reuter, Pankovics et Boros 2011; Chu <i>et al.</i> 2008)
2008	La classification standard ne permet plus de classer les astrovirus nouvellement détectés dans les groupes	Classification selon les critères de similarité de séquences du gène codant pour la capsid	
2011	(9ème rapport de l'ICTV) Modification de la nomenclature à adopter. L'ancienne nomenclature est néanmoins conservée pour assurer la continuité avec les noms définis dans les anciennes publications.	Classification basé sur la prise en compte de deux critères : l'analyse génétique de la séquence complète de l'ORF2 et l'espèce d'hôte originale	(Bosch <i>et al.</i> , 2010a, 2010b; King <i>et al.</i> , 2012)

III. D. Les astrovirus chez les chiroptères

Les nombreux travaux sur les coronavirus menés chez les chiroptères dans les années qui ont suivi la pandémie du SRAS, ont permis de détecter également la présence d'astrovirus chez ces hôtes.

Les premiers astrovirus ont été mis en évidence par Chu *et al.* (2008), chez des minioptères (*Miniopterus magnater* et *M. pusillus*) capturés à Hong Kong. La colonie suivie présentait un taux d'infection de 55%.

Les ORF1b et ORF2 complets ainsi que l'ORF1a partiel d'un astrovirus de minioptère nain (*M. pusillus*), ont pu être séquencés (souche AFCD337, 5083 nt) (figure 23). Ces premiers travaux ont permis de définir des amorces consensus utilisées pour la détection moléculaire d'un large panel d'astrovirus chez les chiroptères, tout en gardant une très bonne sensibilité de détection.

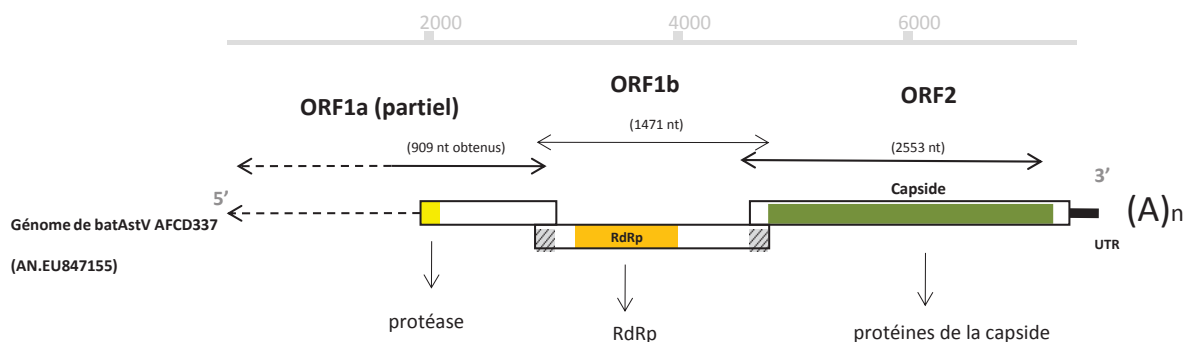


Figure 23 : Génome partiel de l'astrovirus AFCD337 isolé chez *Miniopterus pusillus*. Les comparaisons des séquences d'ORF1b et ORF2 avec celles d'autres Mamastrovirus ont permis d'identifier une nouvelle espèce d'astrovirus (Chu *et al.*, 2008). La séquence d'ORF2 est la plus longue des astrovirus, avec 2 553 nt. Contrairement aux astrovirus aviaires, humains, ovins ou porcins, l'extrémité 3' de l'ORF2 ne présente pas de structure en épingle à cheveux chez les astrovirus chiroptères.

Depuis, de nombreuses études utilisant ces amorces, ont permis de détecter en Chine, en Allemagne et en Hongrie, la présence d'astrovirus chez au moins 37 espèces de chiroptères, principalement insectivores (Table 6). Des prévalences relativement élevées ont été observées au cours de ces recherches. Les études longitudinales sur des colonies ont démontré que l'évolution de la prévalence peut être liée à l'évolution des populations réservoirs : dans l'étude de Chu, la prévalence étudiée est stable selon les saisons (Chu *et al.*, 2008). Drexler montre le potentiel d'amplification des virus (astrovirus et coronavirus) d'une colonie de *Myotis myotis* en Allemagne (Drexler *et al.*, 2011).

Ces études n'ont pas rendu compte de symptômes visibles chez les chiroptères infectés, suggérant ainsi que ces animaux sont capables de supporter de multiples infections et constituent des réservoirs de virus.

D'une manière générale, les astrovirus sont détectés dans les fèces ou les écouvillons rectaux et très peu dans les écouvillons oraux. Lorsqu'un individu présente un écouvillon oral positif, l'écouvillon rectal l'est également (Zhu *et al.*, 2009). Le tropisme du virus chez les chiroptères semble similaire à celui observé chez les autres hôtes mammifères.

Cinq études menées en Chine ont permis d'identifier 27 espèces de chiroptères insectivores et une espèce de roussette, comme réservoir d'astrovirus (Chu *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2014).

Les amorces de détection actuelles permettent d'obtenir un fragment de 434 nt sur le gène de la RdRp (ORF1), dont l'analyse comparative montre une très forte diversité des souches d'astrovirus circulant chez les chiroptères (figure 20).

Seules 14 séquences d'ORF2 d'astrovirus de chiroptères (dont 10 complètes) ont pu être obtenues, limitant considérablement la possibilité de caractérisation de nouvelles espèces selon les critères de classification en vigueur (Chu *et al.* 2008; Zhu *et al.* 2009). En effet,

devant la variabilité génétique du virus, les amorces de séquençage appropriées sont peu efficaces pour obtenir des fragments plus longs du génome. De plus, aucun isolement d'astrovirus de chiroptères en culture cellulaire n'a encore été possible jusqu'à présent, ce qui ne permet pas d'amplifier le matériel génétique viral en vue d'un séquençage à haut débit.

Le manque d'information sur les séquences d'ORF2 ne permet pas non plus d'étudier les potentielles recombinaisons qui peuvent avoir lieu entre les différents sérotypes d'un même groupe d'astrovirus, comme cela a déjà pu être rapporté chez les astrovirus humains (Walter *et al.*, 2001; Wolfaardt *et al.*, 2011).

Les premières études chez les chiroptères laissent présager que la diversité réelle des astrovirus chez ces hôtes en Asie est bien plus importante que ce qui est actuellement décrit. Compte tenu de la possibilité d'infection d'espèces différentes, du nombre d'hôtes potentiels, de la capacité de mutation et de recombinaison du virus, la recherche des astrovirus chez les chiroptères devrait être étendue à d'autres régions et les relations phylogénétiques avec d'autres espèces de *Mamastrovirus*, précisées.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des études menées sur les astrovirus de chiroptères, références et principaux résultats obtenus.

Auteurs, année Journal	Titre de l'article	Région du génome analysée	Lieu de l'étude	Espèces de chiroptères chez qui le virus a été détecté
Chu <i>et al.</i>, 2008 Journal of virology	Novel Astroviruses in Insectivorous Bats	ORF1a (partiel), ORF1b, ORF2 (2500 nt) souche AFCD337 (5067nt)	Chine	<i>Miniopterus magnater</i> <i>Miniopterus pusillus</i> <i>Miniopterus schreibersi</i> <i>Myotis ricketti</i> <i>Myotis chinensis</i> <i>Pipistrellus abramus</i> <i>Rhinolophus rouxi</i>
Zhu <i>et al.</i>, 2009 Journal of General Virology (short communication)	Detection of diverse astroviruses from bats in China	380nt sur RdRp ORF2 (1 500 nt obtenus pour 8 échantillons) 224 astrovirus FJ571065–FJ571140	Chine	<i>Hipposideros armiger</i> <i>Hipposideros larvatus</i> <i>Hipposideros pomona</i> <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> <i>Rhinolophus pearsonii</i> <i>Ia io</i> <i>Miniopterus schreibersi</i>

				<i>Myotis ricketti</i> <i>Myotis spp.</i> <i>Pipistrellus abramus</i> <i>Taphozous melanopogon</i> <i>Megaderma lyra</i>
Xiao <i>et al.</i>, 2011 Archive of Virology	Isolation and phylogenetic characterization of bat astroviruses in southern China	136 aa sur RdRp 230 aa sur ORF2 229 astrovirus détectés	Chine	<i>Miniopterus schreibersi</i> <i>(Yueyang Shaoyang Haikou)</i> <i>Scotophilus kuhlii (Haikou)</i> <i>Rousettus leschenaultia (Haikou)</i>
Wu <i>et al.</i>, 2012 Journal of virology	Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces	387 nt sur RdRp	Chine	<i>Myotis rickeeti (Jiangxi)</i> <i>Rhinolophus sinicus (hunan)</i> <i>Miniopterus schreibersi</i> <i>Tylonycteris robustula (Hainan)</i>
Hu <i>et al.</i>, 2014 Journal of General Virology (short communication)	Detection of diverse novel astroviruses from small mammals in China	380 nt sur RdRp un génome complet (Porcupine astV) obtenu en séquençage Sanger	Chine	<i>Hipposideros armiger</i> <i>Rhinolophus pusillus</i> <i>Rhinolophus affinis</i> <i>Miniopterus schreibersi</i> <i>Miniopterus magnater</i> <i>Myotis horsfieldii</i> <i>Myotis ricketti</i> <i>Scotophilus kuhlii</i> <i>Tylonycteris robustula</i>
Kemenesi <i>et al.</i>, 2014 Vector Borne and Zoonotic Diseases	Molecular survey of RNA viruses in hungarian bats: discovering novel astroviruses, coronaviruses, and caliciviruses	265 nt sur la RdRp	Hongrie	<i>Myotis daubentonii</i> <i>Plecotus auritus</i>
Dufkova <i>et al.</i>, 2015	Detection of Diverse Novel Bat Astrovirus Sequences in the Czech Republic	NA	République Tchèque	<i>Myotis mystacinus</i> <i>Eptesicus serotinus</i> <i>Pipistrellus pipistrellus</i> <i>Vespertilio murinus</i> <i>Hypsugo savii</i> <i>Myotis emarginatus</i> <i>Rhinolophus hipposideros</i> <i>Pipistrellus pygmaeus</i>
Fischer <i>et al.</i>, 2016 Infection, Genetics and Evolution	Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany	Amorces PCR décrites par Chu	Allemagne	<i>Myotis nattereri</i> <i>Myotis daubentonii</i> <i>Myotis bechsteinii</i> <i>Pipistrellis auritus</i>

IV. Les coronavirus

IV. A. Généralités sur le virus

Les coronavirus (CoVs) sont des virus de la famille des *Coronaviridae* qui appartiennent à l'ordre des *Nidovirales*. Ce sont des virus de très grande taille (80 à 160 nm de diamètre), enveloppés et possèdent une capsid à symétrie hélicoïdale, ce qui leur confère une morphologie caractéristique en couronne, d'où leur nom (figure 24).

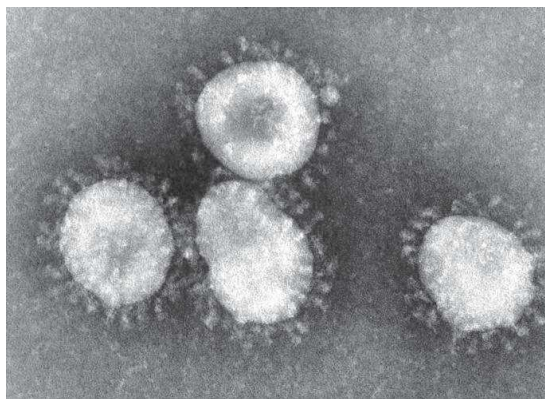


Figure 24 : Coronavirus observés en microscopie électronique. (cliché : Fred Murphy, CDC).

Ils sont organisés en 4 groupes: alpha (α CoV), beta (β CoV), gamma (γ CoV) et delta (δ CoV), récemment découvert (de Groot *et al.*, 2012) (figure 25). Ils sont responsables d'infections respiratoires et intestinales chez de nombreuses espèces aviaires (γ CoV, δ CoV) et mammifères (α CoV, β CoV, γ CoV), dont l'Homme. Leur intérêt en santé publique était limité jusqu'à l'émergence de la souche zoonotique du SRAS-CoV, responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) (Graham *et al.*, 2013). En 2003, cette pandémie qui a touché plus de 8000 personnes dans 33 pays, a accéléré les recherches sur cette famille de virus et sur les zoonoses émergentes. L'émergence du MERS-CoV en 2012 a confirmé l'intérêt d'intensifier la surveillance des coronavirus, d'identifier les réservoirs animaux associés, ainsi que d'étudier leur potentiel zoonotique.

Ce chapitre présente les caractéristiques biologiques générales des coronavirus (structure, génome, cycle de réplication). Nous nous intéresserons ensuite aux souches circulant chez l'Homme et chez les chiroptères, puis nous établirons un bilan des connaissances sur les coronavirus d'origine zoonotique afin de déterminer leurs potentiels zoonotiques.

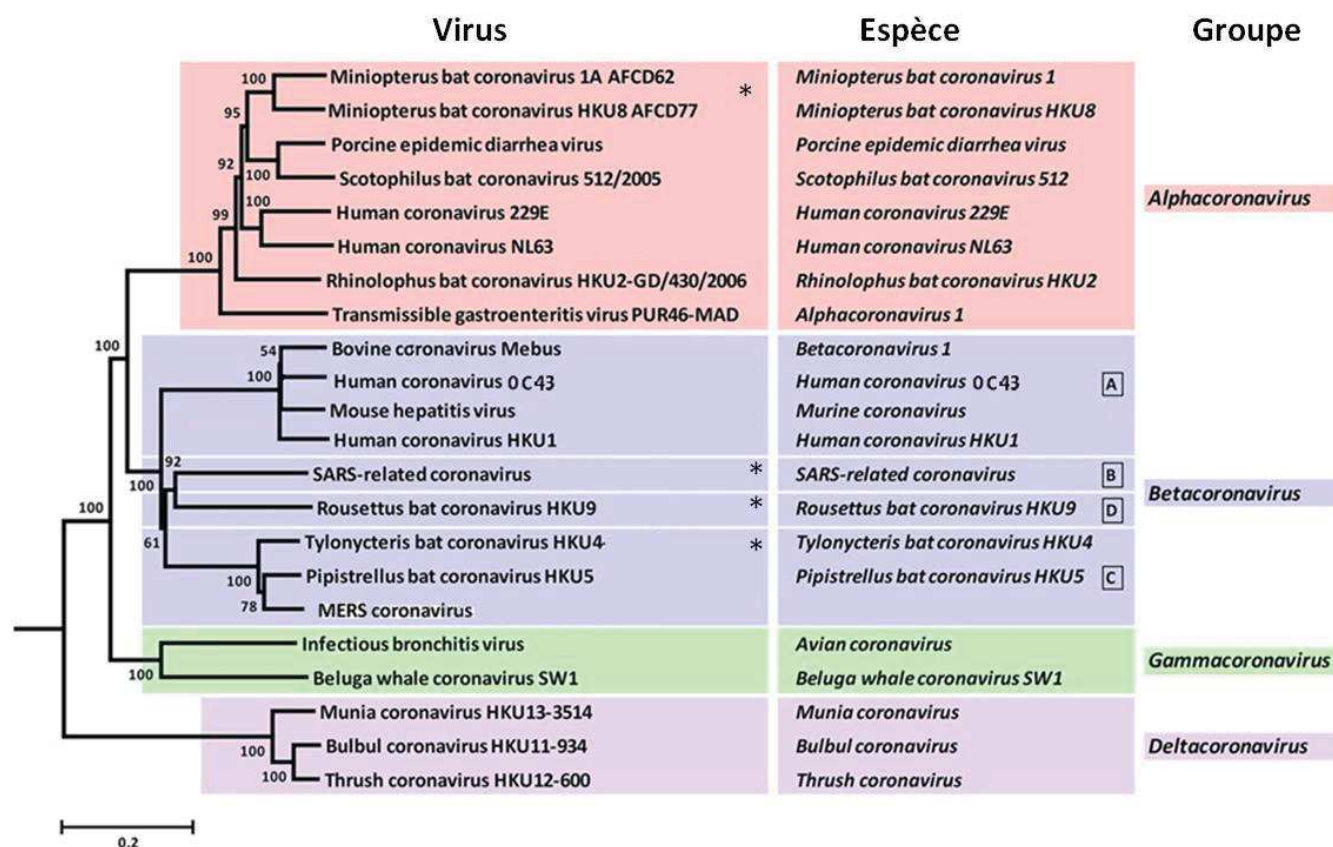


Figure 25 : Classification phylogénétique simplifiée des coronavirus (modifié d'après de Groot *et al.*, 2013). L'arbre est basé sur l'alignement de séquences d'une région de la polyprotéine 1ab, avec une méthode de neighbor-joining, avec 1000 répétitions. La séquence du virus équin Berne-virus (torovirus) est utilisée pour l'enracinement. Les quatre couleurs correspondent aux principaux groupes de CoVs Alpha-, Beta-, Gamma-, et Deltacoronavirus. Au niveau du groupe des BetaCoV, les 4 sous-groupes A, B, C, D sont indiqués par un encadré. Les groupes où des CoVs ont été isolés chez des chiroptères sont indiqués par un astérisque.

IV. B. Caractéristiques virologiques des coronavirus

IV. B.1. Les protéines de structure

Cinq principales protéines structurales sont à l'origine de la morphologie du virus (figure 26). Les protéines de nucléocapside (N) (50-60 kDa) se lient à l'ARN pour former la capside lors de l'assemblage du virion. Elles sont liées aux protéines de membrane (M) (23-35 kDa) qui entourent la capside du virion. Les protéines d'enveloppe (E) sont plus petites (9-12 kDa) et interagissent avec les protéines M pour former l'enveloppe virale.

Les protéines de spicule (S) sont des glycoprotéines membranaires qui forment les pointes de la couronne observée en microscopie électronique. Chaque protéine S est subdivisée en deux sous-unités S1 et S2, correspondant à la partie globulaire et à la tige du spicule (figure 26). Les protéines S (180-220 kDa) jouent un rôle primordial dans l'interaction hôte-virus. Elles sont responsables de l'attachement du virus à la cellule cible (via la sous-unité S1) et de la fusion membranaire (sous-unité S2) qui permet l'entrée du virus dans la cellule. La spicule est également la cible principale des réponses immunitaires cellulaire et humorale de l'hôte et induit la formation d'anticorps neutralisants. En conséquence, elle présente des régions hypervariables lui permettant d'échapper à la pression immunitaire et d'élargir le tropisme cellulaire.

La plupart des β CoVs présentent une glycoprotéine de surface supplémentaire, qui forme des spicules plus petites : l'hémagglutinine-estérase (HE) (65 kDa). L'HE a des propriétés antigéniques par son activité hémagglutinante et acétyl-estérase et induit la formation d'anticorps neutralisants (Brian *et al.*, 1995). Elle jouerait également un rôle important dans l'entrée du virus dans la cellule cible et accentuerait le caractère infectieux du virus (Desforges *et al.*, 2013).

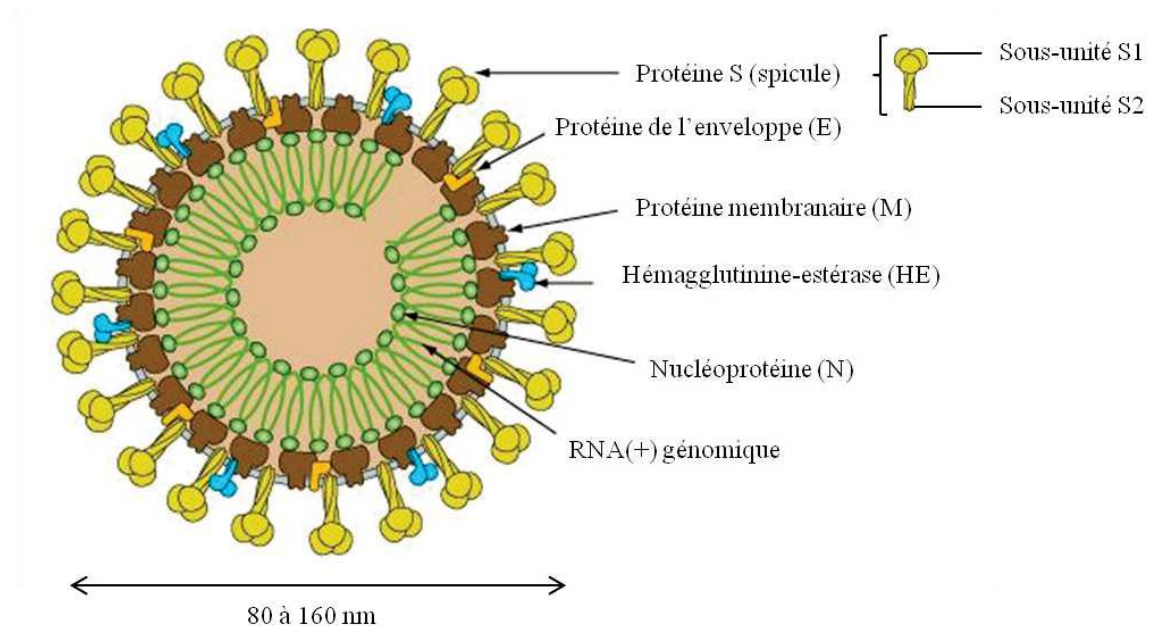


Figure 26 : Schéma simplifié de la structure d'un beta-coronavirus.

IV. B.2. Les protéines non structurales

L'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) est la principale protéine non-structurale des coronavirus. Cette enzyme intervient dans la réplication du virus et permet la synthèse d'ARN subgénomiques (voir partie IV.C). L'hélicase (Hel) intervient dans la réplication du génome viral, dans la régulation de la transcription et traduction ainsi que dans l'épissage des ARNm (Toussaint, 1995). Son rôle crucial dans le cycle viral en fait une cible thérapeutique intéressante. D'autres protéines non structurales sont présentes chez les coronavirus, dont le nombre varie en fonction des espèces, et le rôle est encore méconnu. Les principales sont la protéase papain-like (PLP), la protéine MB (metal-binding) et la protéase-picornavirus-3C-like3 (CLP).

IV. B.3. Organisation du génome

Le génome des coronavirus est constitué d'un ARN monocaténaire, linéaire, non segmenté, de polarité positive. Il est de très grande taille et varie entre 26 et 31,5 kilobases (Kb). Le génome est organisé en 9 cadres de lecture ouverts et les gènes sont arrangés dans un ordre précis 5'-Polymérase-(HE)-S-E-M-N-3' quelque soit le coronavirus (figure 27). Ils codent pour des protéines décrites précédemment, et un nombre variable d'autres gènes codent des protéines non-structurales accessoires. L'extrémité 5' du génome est suivie d'une séquence "leader" de 65 à 98 nucléotides et d'une région non-traduite (UTR 5') de 200 à 400 nucléotides. A l'extrémité 3' est polyadénylée, avec en amont, une séquence non-traduite (UTR3') de 200 à 500 nucléotides.

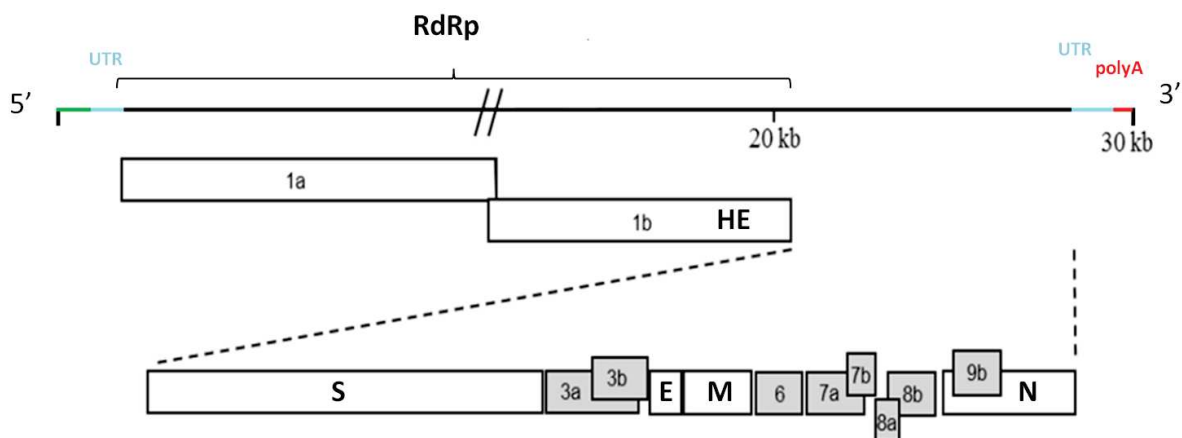


Figure 27 : Organisation schématique du génome d'un coronavirus. Les cadres de lecture ORF1a et 1b contiennent plusieurs gènes codant 16 protéines non structurales (nsp) dont l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) et l'hélicase (Hel). Ils sont séparés par une zone de chevauchement (7-8 nucléotides). Les ORFs 1, 4, 5 et 9 contiennent les gènes codant les protéines de structure, comme les spicules (S), les protéines membranaires (M), les protéines de l'enveloppe (E) et les nucléocapsides (N) sont également présentés (non dessinés à l'échelle). Les huit ORF accessoires (cases grisées) sont ORF 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b et 9b. Les régions non traduites (UTR) aux extrémités 3' et 5' sont représentées en bleu. Les séquences "leader" (ld) en 5' et de la queue poly(A) en 3' sont représentées en vert et rouge respectivement.

Les ORF1a et ORF1b codent pour deux polyprotéines pp1a et pp1b. Entre les ORF1a et ORF1a 1b, une séquence "glissante" de 7 à 8 nucléotides forme une structure en pseudo-

noeud qui engendre décalage de lecture au cours de la traduction, avec une efficacité de 30% (Brian et Baric, 2005). La traduction de l'ORF1ab donnera une polyprotéine plus longue pp1ab, qui inclut l'ARN polymérase ARN-dépendant (RdRp) et d'autres domaines fonctionnels, comme les protéines PLP (protéase papain-like), 3CLP (protéase picornavirus 3C-like), ou encore l'hélicase (Hel). Environ deux-tiers de l'ARN viral sont occupés par ce gène (figure 27). Le tiers restant du génome (~9-10 kb) contient 8 ORFs et comprend les gènes codant pour les protéines structurales et d'autres protéines non-structurales (nsp) accessoires, dont le rôle dans le cycle de vie des coronavirus n'est pas totalement élucidé.

IV. C. Le cycle de réplication des coronavirus

Le cycle de réplication des coronavirus est exclusivement intra-cytoplasmique. Cependant, chez le SRAS-CoV, un signal de localisation nucléaire (SLN) est présent au niveau du gène codant la protéine N (Shi *et al.*, 2003). Des particules virales ont également été détectées dans le noyau des cellules Vero E6 infectées *in vitro* lors de l'infection par le SRAS-CoV (Qin *et al.*, 2004). Cette partie expose les étapes principales du cycle de réplication des CoVs retrouvées chez l'ensemble des coronavirus (figure 28).

IV. C.1. L'entrée dans la cellule

La fixation spécifique du virus à son récepteur cellulaire est la première étape de l'infection virale. Cette liaison se fait via la protéine de spicule (sous-unité S1). La spécificité d'hôte et le tropisme cellulaire sont essentiellement déterminés par la présence des récepteurs cellulaires (Gallagher et Buchmeier, 2001). Selon le coronavirus, le récepteur utilisé diffère

(table 7). Un clivage protéolytique par la L-cathepsine de l'hôte est nécessaire pour activer la sous-unité S2 du spicule qui agit dans la fusion des membranes virales et cellulaires (Bosch *et al.*, 2008) (figure 28 (1)).

Tableau 7 : Récepteurs utilisés pour l'entrée de différentes souches de coronavirus dans leurs cellules cibles

Souche de coronavirus	Hôte principal	Nom du récepteur	Tropisme du récepteur	référence
HCoV-229E	Homme	aminopeptidase N (CD13)	Cellules intestinales, pulmonaires, rénales, jonctions synaptiques, macropahges	(Yeager <i>et al.</i> , 1992)
TGEV CoV	porc			(Delmas <i>et al.</i> , 1992)
HCoV-OC43	Homme	acide N-acétyl-9-O-neuraminique (Neu9Ac)	Cellules du tractus respiratoire	(Vlasak <i>et al.</i> , 1988)
Bovine CoV	bovins		Cellules du tractus respiratoire et du tractus gastro-intestinal	(Schultze et Herrler, 1992)
PEDV-CoV	porc	-CD13 -acide N-acétyl-5-neuraminique	Cellules du tractus gastro-intestinal	(Li <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2015)
HCoV-NL63	Homme	angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)	Cellules endothéliales des vaisseaux cardiaques, cellules rénales, bronches, parenchyme pulmonaire, tractus gastro-intestinal	(Hofmann <i>et al.</i> , 2005)
SRAS-CoV	Homme, chiroptère, civette			(Li <i>et al.</i> , 2003)
Mers-CoV	Camélidés Homme	dipeptidyl peptidase 4 (DPP4)	Cellules épithéliales non ciliées des bronches	(Raj <i>et al.</i> , 2013)

IV. C.2. La réplication du virus

IV. C.2.1. La traduction primaire

Une fois le virus internalisé et décapsidé, l'ORF1 est directement traduit. Cette première étape (Figure 28 (4)) est commune à tous les virus à ARN⁺. La RdRp et 15 autres protéines non structurales sont synthétisées et s'associent pour former le complexe de transcription/réplication (CTR), qui intervient dans la réplication du génome viral ARN⁺ en ARN⁻ et la transcription.

IV. C.2. 2. La transcription de l'ARN viral

Dans un premier temps, le CTR réplique le génome viral en une molécule d'ARN-complémentaire appelée antigénome. L'antigénome est un intermédiaire de réplication qui sert de matrice pour la réplication d'un nouveau génome (ARN+). La réplication est discontinue et stoppe au niveau des séquences de régulation de la transcription (séquences TRS). Ainsi, l'antigénome est un jeu d'ARN-sous-génomiques (sg) de longueurs différentes, qui vont servir de matrice à la synthèse d'ARNm sg (+). Ces ARNm (sg) sont nommés de 1 à 7 selon leur taille décroissante (Figure 28 (5)). Cette particularité est propre à l'ordre des *Nidovirales* auquel appartiennent les *Coronaviridae*, dont le nom provient du latin *Nidus* (nid) en référence à ce jeu d'ARNm (sg) produit lors de l'infection (de Vries *et al.*, 1997).

L'ARNm1 (sg) qui est le plus long, comprend l'ensemble du génome viral et sera encapsidé pour la formation de nouvelles particules virales. Les autres ARNm (sg) seront traduits en protéines utilisées pour la synthèse de nouveau virons. Durant tout le cycle de réplication, les coronavirus utilisent également la machinerie cellulaire de l'hôte infecté.

IV. C.2. 3. La traduction des ARNm (sg) en protéines et la formation de nouveaux virions

Les ARNm (sg) sont traduits en protéines nsp et structurales (Figure 28 (6)). Les protéines N se fixent à l'ARN+ viral pour former la nucléocapside, qui est assemblée aux protéines structurales M, S, HE et E au niveau du réticulum endoplasmique (RE), où elles subissent leur maturation. Une fois assemblés, les virions sont dirigés vers l'appareil de Golgi où ils subissent une nouvelle maturation par glycosylation (Figure 28 (7)).

IV. C.3. La sortie du virus par exocytose

Les vésicules contenant les virus mûres bourgeonnent de l'appareil de Golgi puis fusionnent avec la membrane cellulaire avant que les virions ne soient libérés (Figure 28 (8)). Les CoVs entraînent une cytolysse *in vitro* (Qin *et al.*, 2004), mais leur capacité à tuer la cellule après une infection *in vivo* n'est pas généralisable à l'ensemble des CoVs.

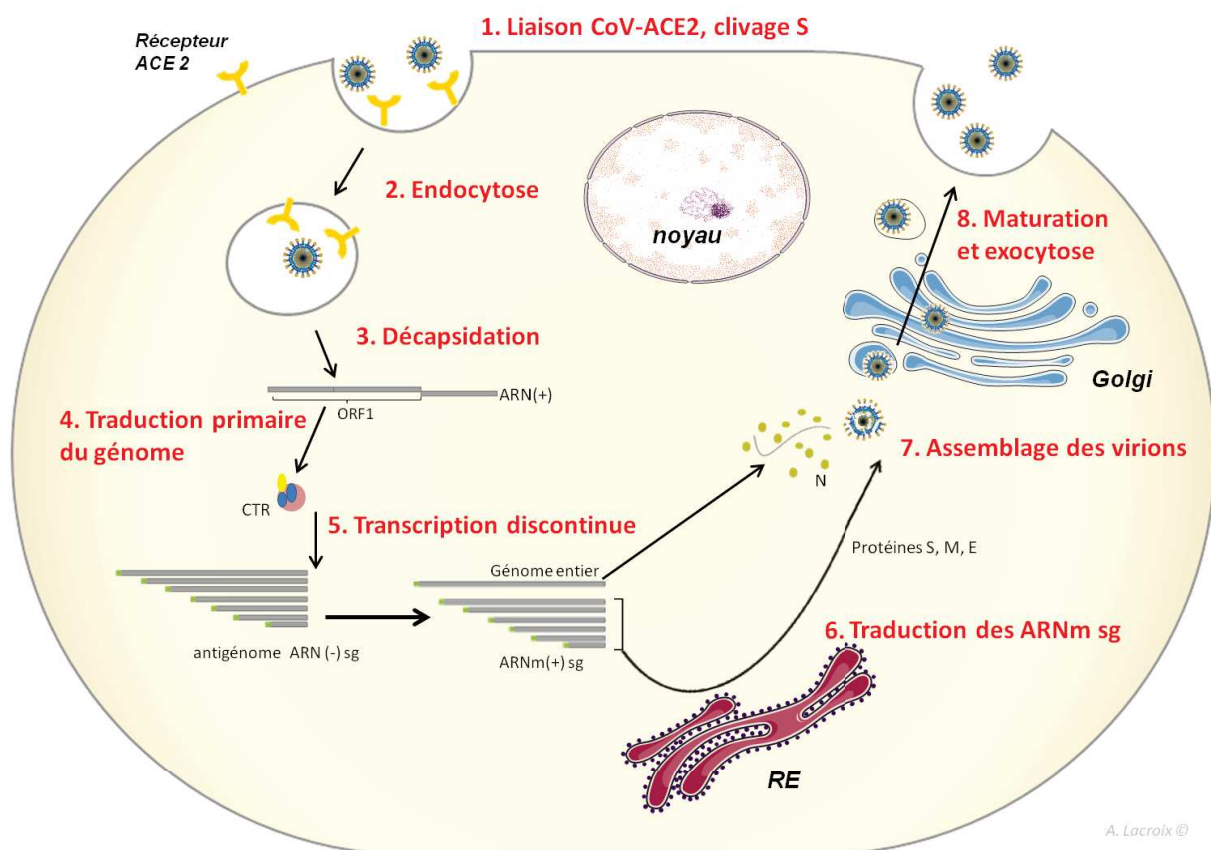


Figure 28 : Schéma du cycle de réplication du coronavirus. RE : réticulum endoplasmique; Golgi : appareil de Golgi; CTR : complexe de transcription/réplication; S : protéine de spicule; M : protéine de membrane; E : protéine d'enveloppe; ACE2 : Enzyme de conversion 2 de l'angiotensine.

IV. D. Les coronavirus humains

Six CoVs sont pathogènes chez l'Homme, provoquant des maladies très diverses allant du rhume banal au syndrome respiratoire aigu. Les CoVs humains (hCoVs) les plus fréquents sont les hCoV-OC43, hCoV-229E, hCoV-NL63 et hCoV-HKU1. Les coronavirus responsables de syndrome respiratoire aigus sont les souches du SRAS-CoV et du MERS-CoV qui a récemment émergé au Moyen-Orient. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le [tableau 8](#).

IV. D.1. Pathologie des coronavirus humains (hors SRAS et MERS)

Avant la pandémie du SRAS, les hCoVs étaient considérés comme d'intérêt mineur en santé publique. Ils engendrent des infections respiratoires bénignes des voies aériennes supérieures. Avec les rhinovirus, les coronavirus sont considérés comme les principaux agents du rhume (Myint, 1995; Vabret *et al.*, 1998). Ce sont des virus ubiquitaires qui touchent toutes les tranches d'âge et la séroprévalence est élevée au sein de la population humaine. Chez les populations vulnérables comme les nouveau-nés, les personnes âgées ou les immunodéprimés, ils peuvent être responsables de pathologies plus graves des voies respiratoires inférieures, comme la pneumonie, l'asthme, ou encore certains syndromes de détresse respiratoire (Vabret *et al.*, 2005). Les coronavirus humains se transmettent principalement de façon directe, via les sécrétions nasopharyngées dispersées par la toux et les éternuements d'une personne infectée.

Des études récentes démontrent que les hCoVs sont également neurotropiques (Desforges *et al.*, 2014). Leur potentiel neuro-invasif a été mis en évidence et pourrait être associé au déclenchement et l'exacerbation de certaines maladies neurologiques (Arbour *et al.*, 1999).

Chez des patients atteints de sclérose en plaques, l'infection par les coronavirus OC43 et/ou 229E participerait à la dégénérescence des cellules myélinisées (Arbour *et al.*, 1999, 2000).

IV. D.2. Aspects pathologiques du syndrome respiratoire aigu sévère chez l'Homme

L'infection par le SRAS-CoV engendre des symptômes grippaux banals et peu pathognomoniques durant les 4 à 6 premiers jours de l'infection (hyperthermie, frissons, courbatures, anorexie). Ils sont suivis de troubles respiratoires (toux, dyspnée) et de douleurs pharyngées. Dans 20% des cas, des troubles digestifs sont également rapportés (nausées, vomissements, diarrhées). Un patient sur cinq va évoluer vers un syndrome de détresse respiratoire aigu sévère, nécessitant une assistance respiratoire. L'état évolue vers une aggravation de la fonction respiratoire (lésions alvéolaires, atelectasie, inflammation et œdème pulmonaires) pouvant entraîner la mort, ou vers la guérison. Chez ces derniers, des séquelles pulmonaires (fibrose des tissus pulmonaires) ou des effets des secondaires dus à la corticothérapie prolongée, peuvent apparaître (Vabret *et al.*, 2005). Le taux de mortalité dépend du statut immunitaire et de l'âge des individus infectés. Lors de la pandémie de 2003-2004, ce taux était d'environ 10%.

Le MERS-CoV, qui a été détecté pour la première fois en 2012, engendre des symptômes initiaux similaires au SRAS, qui évoluent plus fréquemment vers une pneumonie sévère nécessitant l'hospitalisation et une assistance respiratoire. Le virus a un fort tropisme pour les cellules épithéliales bronchiques non-ciliées (Chan *et al.*, 2014). Chez certains patients, l'infection par le MERS-CoV entraîne des défaillances viscérales, dont rénale aigue. La maladie évolue vers la mort dans 36% des cas (Vijay et Perlman, 2016).

Les virus du MERS et SRAS se transmettent par voie aérienne. La transmission interhumaine du virus du SRAS est extrêmement efficace (8000 cas dans 33 pays en quelques mois), tandis que celle du MERS reste limitée et nécessite un contact étroit avec un patient infecté . Aucune transmission interhumaine durable n'a encore été rapportée pour ce virus (Zumla *et al.*, 2015). Les cas rapportés proviennent souvent d'une contamination des sujets par les camélidés infectés par le virus MERS (Memish *et al.*, 2014).

Tableau 8 : Les souches de coronavirus circulant chez l'Homme.

Nom de la souche	hCoV-OC43	hCoV-229E	hCoV-NL63	hCoV-HKU1	SRAS-CoV	MERS-CoV
groupe	βCoV, lignée A	αCoV	αCoV	βCoV, lignée A	βCoV, lignée B	βCoV, lignée C
Première description	1965 (Hamre et Procknow, 1966)	1965 (Tyrrell et Bynoe, 1965)	2004: Amsterdam, chez un bébé de 7 mois, présent une bronchiolite aiguë (van der Hoek <i>et al.</i> , 2004)	2005: détecté à Hong Kong chez patient revenant de Shenzhen (patient 71 ans) (Woo <i>et al.</i> , 2005)	- Emergence : 2002, premiers cas (Guangdong, Chine) - Février à Juillet 2003: pandémie de SRAS déclarée officiellement par l'OMS	2012, Arabie Saoudite (toujours en cours)
Principales caractéristiques	-Agents communs d'infections respiratoires bénignes (rhumes) et saisonnières -peut s'aggraver selon le statut immunitaire (personne immunodéprimée, maladie neurologique, coïnfection.) et l'âge du patient (nouveau-nés, personnes âgées) -distribution mondiale				Agent de syndrome respiratoire sévère aigu et pneumopathie grave	
					8098 cas (774 décès) rapportés dans 33 pays	1769 cas (633 décès) rapportés à ce jour dans 26 pays
Transmission interhumaine	Par voie aérienne (gouttelettes de sécrétions oropharyngées)				Par voie aérienne	Par voie aérienne Transmission limitée, nécessite un contact très étroit avec la personne infectée
Contagiosité	+++ Transmission interhumaine efficace				++++ Transmission interhumaine très efficace	+ Pas de transmission interhumaine durable
Durée d'incubation	2 à 3 jours				2 à 10 jours	
Symptômes initiaux	-Infection des voies respiratoires supérieures, toux, dyspnée -symptômes grippaux rapportés (hyperthermie, frissons, courbatures, anorexie)				- Symptômes grippaux dans les 4 à 6 premiers jours -toux, infection respiratoire	-Hyperthermie, toux, difficulté respiratoire
	- rhinite, rhume, maux de gorge	Agent commun de la rhinite	Agent de laryngo-trachéite	le rhume, la bronchiolite et la pneumonie,		
Autres symptômes	-troubles digestifs parfois rapportés				-Troubles digestifs (dans 20% des cas)	-troubles digestifs -défaillance organique -insuffisance rénale grave
Evolution de la maladie/mortalité	-Guérison dans la majorité des cas, aggravation selon l'état initial du patient. -si maladie neurologique, possibilité d'aggravation de la pathologie (démyélinisation des neurones)				- Evolution dans 20% des cas, vers un syndrome respiratoire sévère -mortalité : 10%des cas *	-Evolution une pneumopathie sévère, assistance respiratoire -mortalité :70% des cas*
Source du virus	Hypothèse d'une origine zoonotique (souche de CoV bovine) (Vijgen <i>et al.</i> , 2005)	Hypothèse d'une origine zoonotique (souche de CoV chiroptère) (Pfefferle <i>et al.</i> , 2009a)	Hypothèse d'une origine zoonotique (CoV de chiroptère) (Huynh <i>et al.</i> , 2012a)	CoV endémique chez l'Homme. hypothèse d'une origine zoonotique non vérifiée (Al-Khannaq <i>et al.</i> , 2016; Woo <i>et al.</i> , 2006b)	Zoonotique: - hôte intermédiaire: civette palmée - réservoir: chiroptère (<i>Rhinolophus</i> sp.)	Zoonotique: - contact avec Camélidés infectés -origine probable: chiroptère

*Dépend de l'âge et du statut immunitaire de la personne infectée

IV. E. Les coronavirus d'origine animale

IV. E.1. Les coronavirus touchant les mammifères d'élevage

Les CoVs ont un vaste panel d'hôtes aviaires et mammifères, qui ne sera pas détaillé dans ce travail. Chez les mammifères d'élevage, notamment les bovins et porcs, ils représentent une problématique importante.

Chez les bovins, les coronavirus sont responsables de la dysentrie hivernale et d'infections respiratoires courantes. Des souches d'αCoV affectent l'élevage porcin: la souche PRCV (pour Porcine Respiratory Coronavirus) engendre des infections respiratoires importantes (Laude *et al.*, 1998). Les virus de gastro-entérite transmissible (TGEV) et de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) provoquent des épisodes de gastroentérites sévères qui augmentent significativement la mortalité dans les élevages porcins (Savey et Laude, 1979). Depuis 2013, le PEDV est devenu un réel problème sanitaire aux Etats-Unis, en Asie et en Amérique centrale et du Sud (Song *et al.*, 2015).

IV. E.2. La circulation des coronavirus chez les chiroptères

Outre la détection de nombreux virus zoonotiques chez les chiroptères (lyssavirus, hénipavirus), la détection des souches de CoV apparentées au SRAS (nommées SL-CoV pour SRAS-like CoV) chez des rhinolophes (*R. pussilus* et *R. ferrumequinum*) a confirmé le rôle des chiroptères en tant que réservoirs de maladies émergentes (Li *et al.*, 2005). Cette découverte a impulsé les études sur la circulation des CoVs chez ces hôtes.

A ce jour, 45 études rapportent la circulation de CoVs chez plus de 130 espèces de chiroptères, représentant 11 familles et 44 genres à travers le monde ([Annexe 2](#)). Une forte

diversité d' α CoVs et β CoVs a été détectée chez de nombreuses espèces chiroptères frugivores (ptéropodidés) et insectivores dans divers environnements : urbains, naturels, forêt, grottes, guano. Il est important de souligner que certaines de ces espèces sont en contact plus étroit avec l'Homme à cause de la modification des paysages et l'exploitation de l'environnement et des ressources. Si certains CoVs semblaient présenter une spécificité d'hôtes, cette hypothèse semble être réfutée pour la plupart des CoVs, au fur et à mesure des recherches et de la détection des souches chez un nombre croissant d'espèces hôtes. C'est le cas des β CoVs du sous-groupe D (BatCoV-HKU9), attribués aux roussettes uniquement (Woo *et al.*, 2007), jusqu'à la découverte de souches similaires en Thaïlande et en Indonésie chez des chiroptères du genre *Hipposideros* et *Dobsonia* respectivement (Anindita *et al.*, 2015; Wacharapluesadee *et al.*, 2015).

Le groupe des β CoVs requiert particulièrement l'attention des scientifiques car il inclut les sous-groupes du SRAS-CoV (sous-groupe B) et du MERS-CoV (sous-groupe C) pour lesquels le potentiel zoonotique a déjà été prouvé.

Les CoVs apparentés au SRAS-CoV, SL-CoV ont été détectées chez 6 espèces de chiroptères insectivores dans diverses provinces de Chine, à Hong Kong et à Taiwan (Li *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006a; Yang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016). Muller et Tong ont mis en évidence la circulation de souches SL-CoV chez 8 espèces de chiroptères en Afrique, sans avoir pu isoler le génome (Müller *et al.*, 2007; Tong *et al.*, 2009). En 2010, Quan détermine le génome complet d'un SL-CoV chez l'espèce *Hipposideros commersoni* (Quan *et al.*, 2010) au Nigeria.

Woo *et al.* (2006) ont identifié deux souches de CoVs différentes (BatCoV-HKU4 et BatCoV-HKU5) chez des chiroptères du genre *Pipistrellus* et *Tylonycteris* à Hong-Kong. Elles forment un sous-groupe distinct parmi les β CoVs, le sous-groupe C (Woo *et al.*, 2006a,

2007). La souche zoonotique du MERS-CoV, qui a émergé en 2012, appartient également à ce sous-groupe. La proximité de BatCoV-HKU4 et BatCoV-HKU5 avec la souche du MERS-CoV (respectivement 85,3% et 88,7% d'identité sur les séquences protéiques) soulève une potentielle origine chiroptère du MERS-CoV (Lau *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), même s'il a été prouvé que la transmission à l'Homme des CoV-HKU4 et CoV-HKU5 n'est pas efficace (Yang *et al.*, 2014). En 2014, la détection du NeoCoV chez une sérotine d'Afrique du Sud (*Neoromicia capensis*) présentant 97.2% de similitude avec le génome du MERS-CoV confirme l'hypothèse de l'origine chiroptère de la souche (Corman *et al.*, 2014).

Plusieurs auteurs ont identifié des α CoVs chez de nombreux genres de chiroptères ([Annexe 2](#)). Sur la base du gène de la polymérase, ces α CoVs présentent de 54 à 75 % de similarité au niveau des acides nucléiques avec les autres CoVs non chiroptères. Ces souches sont très divergentes mais restent génétiquement plus proches de souches isolées chez les animaux domestiques que les CoVs humains, à l'exception d'un α CoV identifié chez un *Hipposideros*, qui présente 92% de similarité avec le hCoV-229E (Corman *et al.*, 2015; Pfefferle *et al.*, 2009). Ceci consolide l'hypothèse de l'origine zoonotique et chiroptère de nombreux CoVs pathogènes chez l'Homme (Huynh *et al.*, 2012; Corman *et al.*, 2015).

D'une manière générale, la diversité des coronavirus est plus importante chez les chiroptères et les espèces aviaires (Woo *et al.*, 2009). Ceci serait en lien avec leur diversité d'espèces, leur capacité de vol, les pressions environnementales subies par ces espèces et leur mode de vie en communauté. Les analyses moléculaires soutiennent l'hypothèse que les delta-coronavirus se seraient diversifiés à partir d'un pool génétique de CoVs aviaires. De la même manière, les α CoVs et β CoVs auraient évolués à partir d'un pool génétique provenant de CoVs chiroptères, en se diversifiant et acquérant l'aptitude à franchir la barrière d'espèce

(figure 29). Ceci peut également conduire à l'émergence de souches zoonotiques aux conséquences dramatiques (Vijaykrishna *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2009).

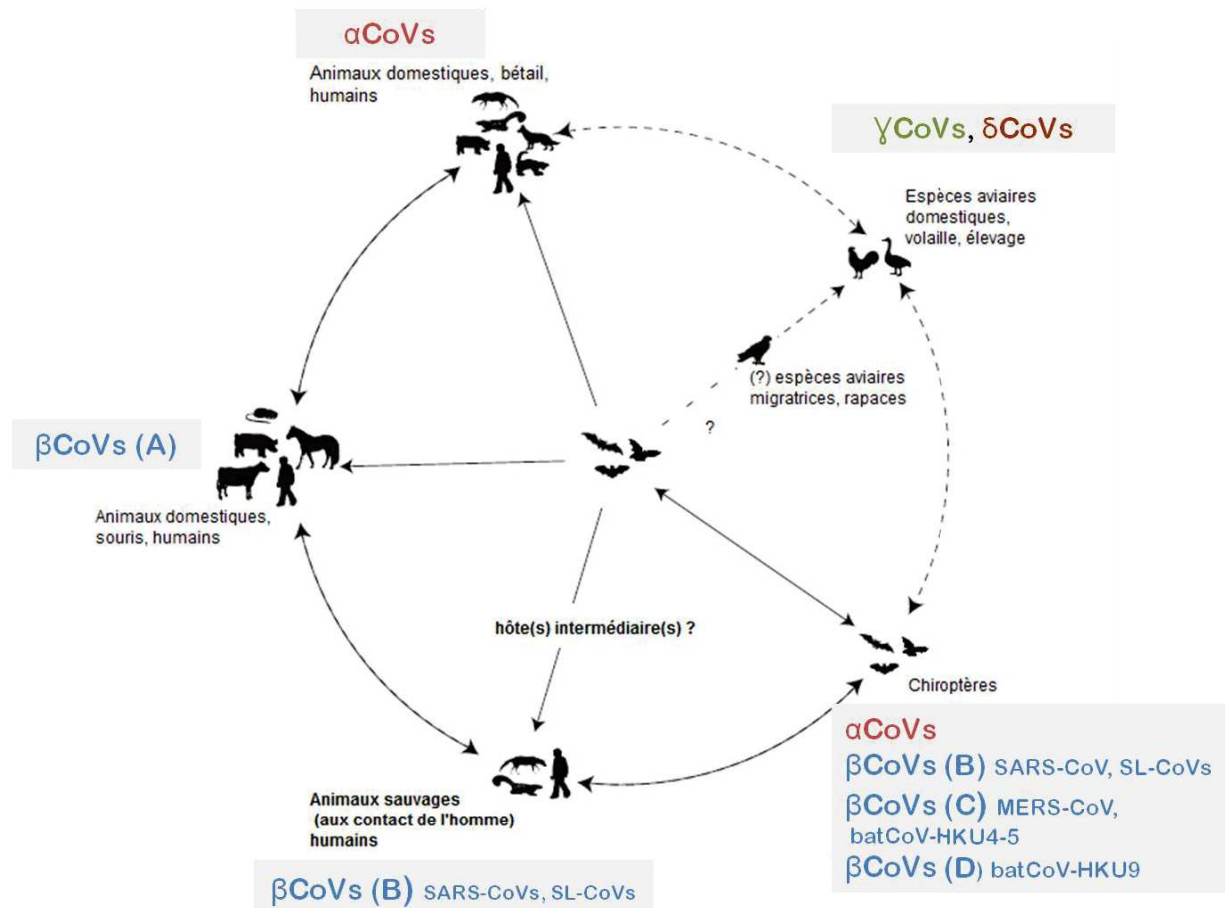


Figure 29 : Hypothèses sur l'origine et l'évolution des coronavirus (CoVs) des groupes alpha (αCoV), beta (βCoV) gamma (γCoV) et delta (δCoV). Chez les βCoVs, le sous-groupe est indiqué entre parenthèses. Les flèches représentent les voies d'évolution des CoVs. Les voies de transmission inter-espèces hypothétiques, flèches pointillées (modifié d'après Vijaykrishna *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2009).

IV. F. Le potentiel zoonotique des coronavirus

La partie I de cette synthèse bibliographique a expliqué les mécanismes généraux qui favorisent l'émergence de virus zoonotiques provenant de la faune sauvage. L'objectif de cette partie est de comprendre comment les CoVs zoonotiques peuvent passer la barrière d'espèce et devenir infectieux chez l'Homme. Le potentiel zoonotique est défini par la capacité du virus à effectuer son cycle chez l'hôte humain, c'est à dire (i) infecter la cellule d'un nouvel hôte et (ii) s'y multiplier. Cette partie évoque les mécanismes qui interviennent dans ces étapes et qui ont permis à certaines souches de CoV, comme le SRAS-CoV ou le MERS-CoV, de devenir transmissibles à l'Homme.

IV. F.1. La capacité d'évolution des coronavirus

La capacité d'adaptation des CoVs repose en partie sur la diversité génétique. La stratégie principale des virus à ARN, pour faciliter leur adaptation à des environnements nouveaux, repose sur la faible fidélité de la réplication des génomes et l'absence des fonctions de relecture et de réparation du génome répliqué.

Les CoVs se distinguent par la longueur exceptionnelle de leurs génomes (~29 Kb), dont la réplication nécessite un contrôle fin de la fidélité, et paradoxalement par leur capacité à produire une diversité de souches capable d'émerger chez de nouveaux hôtes (Sheahan *et al.*, 2008). Les CoVs ont la particularité d'exprimer des protéines non structurales distinctes de la RdRp, qui modulent la fidélité de la réplication génomique et conditionnent ainsi l'adaptabilité du virus par rapport à l'environnement (Smith et Denison, 2013). Chez le SRAS-CoV, la nsp 14 est une exoribonucléase (ExoN) capable *in vitro* d'adapter la fidélité de

la réplication du génome viral en fonction de l'environnement et des pressions de sélection de l'hôte (Minskaia *et al.*, 2006; Eckerle *et al.*, 2007, 2010; Smith *et al.*, 2013). La nsp10 est une petite protéine virale non enzymatique, qui interviendrait dans sa régulation (Smith *et al.*, 2015).

L'analyse bioinformatique du gène S suggère un fort taux de polymorphisme (Ren *et al.*, 2006) et de recombinaisons (Graham et Baric, 2010). Certaines portions clés de la sous-unité protéique S1 présentent une variabilité encore plus élevée: c'est le cas des sites du RBD impliqués dans la liaison avec le récepteur et dans l'induction d'anticorps neutralisant par l'hôte (Eckerle *et al.*, 2010; Denison *et al.*, 2011).

Un des autres modes évolutifs des coronavirus est le potentiel élevé de leurs recombinaisons génétiques, notamment lors d'une coïnfection par des CoVs d'espèces différentes (Su *et al.*, 2016). Le gène codant pour la spicule est particulièrement affecté par ces événements de recombinaison, qui a des conséquences sur le tropisme cellulaire, l'entrée dans les cellules cibles et donc le passage de la barrière d'espèce (Graham et Baric, 2010; Lu *et al.*, 2015).

Ils sont suggérés dans l'émergence des CoVs humains à partir de CoVs chiroptères, comme le CoV-229E (Corman *et al.*, 2015), le SRAS-CoV (He *et al.*, 2004), le CoV-HKU1 (Woo *et al.*, 2009, 2006b), le CoV-OC43 (Vijgen *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2011), ou encore le MERS-CoV (Corman *et al.*, 2014; Sabir *et al.*, 2016).

IV. F.2. La protéine S, protéine clé de l'entrée cellulaire : le rôle du clivage préliminaire et l'interaction avec le récepteur dans la transmission des coronavirus

L'affinité du virus avec les récepteurs d'entrée dans les cellules cibles conditionne le tropisme cellulaire, l'entrée dans la cellule et donc le passage de la barrière d'espèce

(Gallagher et Buchmeier, 2001). La configuration de la protéine de spicule S, et des deux sous-unités S1 et S2 qui la composent, est primordiale dans cette étape du cycle cellulaire (Li *et al.*, 2005). Les protéases de l'hôte sont également déterminantes (Lu *et al.*, 2015; Millet et Whittaker, 2015).

La sous-unité S1 contient un domaine de liaison au récepteur (RBD) qui conditionne la liaison avec le récepteur cellulaire (Xiao *et al.*, 2003; Babcock *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). Cette région protéique S1 est très variable, ce qui engendre des modifications d'affinité avec le récepteur cellulaire.

La sous-unité S2 de la glycoprotéine S doit être activée par clivage protéolytique pour induire la fusion des membranes cellulaires et virales. Ce processus préliminaire de clivage dépend des enzymes de l'hôte (Lu *et al.*, 2015) et divers mécanismes peuvent intervenir en fonction des coronavirus.

La variabilité du RBD et les stratégies d'activation de la fusion sont 2 étapes clés du tropisme et l'entrée des CoVs dans les cellules humaines et expliquent pourquoi les coronavirus seraient transmissibles à l'Homme. Nous allons voir les caractéristiques de ces deux étapes chez les CoVs zoonotiques ou ayant un potentiel zoonotique.

IV. F.2.1. Chez le SRAS-CoV

Le RBD est la région de S1 contenant acides aminés 318 à 510 impliqués dans la liaison avec le récepteur cellulaire humain ACE2. Deux résidus, hautement conservés (479 et 487) sont critiques pour l'affinité entre le RBD du SRAS-CoV et le récepteur. En créant une souche chimérique de SL-CoV de chiroptère, exprimant le RBD du SRAS-CoV, Becker

prouve *in vitro* que celle-ci est apte à utiliser le récepteur ACE 2 et infecter les cellules humaines (Becker *et al.*, 2008).

Le clivage protéolytique de la sous-unité S2 de la glycoprotéine S qui induit la fusion des membranes cellulaires et virales, peut être induit par:

- des L-cathepsines ou trypsines-like de l'hôte, qui clivent la sous-unité S2 au niveau de sites spécifiques entre S1 et S2 (R667 et S668 pour la trypsine, T678 et M679 pour la L-cathepsine) (Bertram *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2015).

- l'action des sérines protéases transmembranaire de type II (appelées TMPRSS2) (Shulla *et al.*, 2011; Bertram *et al.*, 2012). Ces protéases sont exprimées à la surface des cellules du tractus respiratoire et digestif, ce qui peut expliquer le tropisme digestif parfois associé à l'infection par le SRAS-CoV.

IV. F.2.2. Chez le MERS-CoV

Chez le MERS-CoV, la conformation du spicule est similaire à celle du SRAS-CoV même si les séquences respectives sont divergentes. Le RBD est constitué de 302 aa (E382 à C585) qui se lie au récepteur des cellules ciblées, la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4 ou CD26) (Raj *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). La présence de ce récepteur chez l'hôte détermine donc l'éventail d'hôtes potentiels (Lu *et al.*, 2015). De plus, le RBD montre des variabilités entre les différentes souches et détermine la capacité à entrer dans les cellules hôtes donc le potentiel infectieux du virus (Kim *et al.*, 2016).

Les essais *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que le MERS-CoV est capable d'entrer dans les cellules de nombreuses espèces de mammifères (chèvre, porc, civette, dromadaire, chiroptère, primates) (Doremalen *et al.*, 2014).

Le MERS-CoV se distingue par la pluralité des mécanismes d'activation de la fusion membranaire, via la sous-unité S2 du spicule, ce qui augmente le potentiel infectieux des souches de MERS-CoV. L'activation de la fusion membranaire peut s'effectuer par :

- des cathepsines endosomales, de la même manière que chez le SRAS-CoV (Gierer *et al.*, 2013),

- des sérines protéases transmembranaires de type II (appelées TMPRSS2) (Gierer *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2013; Shirato *et al.*, 2013). Leur rôle dans l'entrée cellulaire d'autres virus respiratoires (virus influenza A, metapneumovirus, SRAS-CoV) a déjà été prouvé (Shirogane *et al.*, 2008; Bertram *et al.*, 2012).

- clivage protéolytique en deux temps via la furine (Burkard *et al.*, 2014; El Najjar *et al.*, 2015; Millet et Whittaker, 2014). Ce procédé est utilisé par de nombreux α CoVs dans le processus infectieux. La furine est exprimée par de nombreuses cellules expliquerait le polytropisme cellulaire du virus et l'étendue du panel d'hôtes potentiels.

IV. F.2.3. Chez le CoV-HKU4, un coronavirus de chiroptère

Le CoV-HKU4, appartenant au sous-groupe du MERS-CoV, a été identifié chez des *Tylonycteris* à Hong Kong en 2006 (Woo *et al.*, 2006a). Le CoV-HKU4, comme le MERS-CoV, utilise le récepteur DPP4 pour l'entrée dans les cellules (Wang *et al.*, 2014). *In vitro*, Yang *et al.* ont prouvé que l'affinité du CoV-HKU4 pour le récepteur DPP4 humain était plus forte que pour le récepteur DPP4 chiroptère (Yang *et al.*, 2015). Cependant, les protéases humaines ne permettent pas l'activation de la sous-unité S2 pour la fusion des membranes donc l'entrée dans la cellule cible, contrairement aux protéases chiroptères. La capacité du MERS-CoV à entrer dans les cellules humaines, et donc à infecter l'Homme est basée sur l'étape de clivage de la protéine S (Qian *et al.*, 2013). Le risque zoonotique de ce CoV

chiroptère est réel et exacerbé par la multiplicité des mécanismes d'entrée cellulaire potentiels exposés précédemment. Il est suggéré que cet événement a déjà eu lieu avec la souche du MERS-CoV, qui aurait ainsi capable de passer de l'hôte chiroptère aux hôtes camélidés puis humains.

IV. F.3. La capacité à se multiplier dans la cellule infectée

Les coronavirus utilisent la machinerie cellulaire de l'hôte pour effectuer leur cycle de réplication (Tyrrell et Myint, 1996; Laude, 2003; Thiel, 2007). Il est également démontré qu'au cours de son cycle, le virus module plusieurs voies de signalisation cellulaire impliquées dans la réponse immunitaire, le métabolisme et le cycle de la cellule (Perlman et Netland, 2009).

Une partie du potentiel zoonotique réside dans la capacité des CoVs à évoluer et trouver des stratégies pour échapper à la réponse immunitaire innée des hôtes (Reghunathan *et al.*, 2005; Perlman et Netland, 2009). Les protéines non structurales nsp1 et nsp3 du SRAS-CoV (codées par les ORF3b et ORF6 respectivement) inhibent les voies de synthèse des INFs de type I (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007; Wathelet *et al.*, 2007). Ces nsp sont des facteurs de virulence qui contribuent à augmenter la réplication du SRAS-CoV. Il n'y a, à ce jour, pas de connaissances sur l'impact de l'infection à CoV sur la réponse immunitaire adaptative (lymphocytes T et B). De plus, lors de l'infection par le SRAS-CoV, la protéine de nucléocapside N module la voie de signalisation de l'AP-1 (He *et al.*, 2003). L'AP-1 est un facteur de transcription régulant les gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose (Shaulian et Karin, 2002).

IV. G. Traitement et avancées thérapeutiques face au syndrome respiratoire aigu sévère

Aucun traitement ni vaccin efficace contre l'infection du SRAS n'a pu être développé (Groneberg *et al.*, 2005; Graham *et al.*, 2013). Aucune molécule anti-virale ne s'est montrée efficace durant l'épidémie de SRAS, même si, *in vitro*, la ribavirine, lopinavir ou l'interféron (INF) de type I inhibent la réplication du virus sur cultures cellulaires (Stockman *et al.*, 2006). Les soins se réduisent au seul traitement des symptômes associés. De plus, des stéroïdes pour soigner le dérèglement des cytokines et d'antibiotiques et prévenir les infections secondaires, sont souvent administrés. Les facteurs que nous venons de voir et qui contribuent au potentiel zoonotique et pathogène des CoVs permettent de développer de récentes pistes thérapeutiques, plus intéressantes.

Le spicule constitue une cible thérapeutique privilégiée (Bergeron *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2009; Gierer *et al.*, 2013; Simmons *et al.*, 2013; Millet et Whittaker, 2014), notamment au niveau des sites de clivage protéolytique sur la sous-unité S2 (Miyoshi-Akiyama *et al.*, 2011) et de la sous-unité S1. Sur cette dernière, une région du RBD induit la sécrétion d'anticorps neutralisants par l'hôte (aa 736 à 761 chez le MERS-CoV), et pourrait être utilisée pour développer des molécules antivirales ou des vaccins (Yang *et al.*, 2014).

Cibler les protéases de l'hôte pour inhiber l'entrée du virus, plutôt que les protéines virales serait une stratégie thérapeutique qui permettrait de réduire les résistances (Turk, 2006). Cette stratégie a été longuement étudiée pour le traitement des infections au SRAS et MERS-CoV (Barnard *et al.*, 2004; Bergeron *et al.*, 2005; Gierer *et al.*, 2013; Simmons *et al.*, 2013; Millet et Whittaker, 2014). Cependant, les effets secondaires sont encore peu maîtrisés

in vivo, car les protéases sont également impliquées dans un grand nombre de procédés cellulaires chez l'individu sain (Turk, 2006; Seidah et Prat, 2012).

Les protéines non-structurales (nsp) récemment découvertes, qui interviennent dans la réplication du génome coronaviral (nsp14-ExoN et nsp10), pourraient également jouer un rôle dans la sensibilité des CoVs aux agents mutagènes et représentent une piste thérapeutique intéressante (Smith *et al.*, 2013, 2015).

Chapitre 2 : La détection des coronavirus chez les chiroptères au Laos et au Cambodge

Contexte et objectif de l'étude

Les coronavirus peuvent causer des infections respiratoires aiguës chez l'Homme. Le SRAS-CoV (ou SARS en anglais) est responsable de la plus grande pandémie de syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) qui a infecté plus de 8000 personnes et en a tué plus de 700 à travers 33 pays entre 2002 et 2004 (Peiris *et al.*, 2003). L'émergence d'une nouvelle souche à l'origine du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS), apparue en 2012, et détectée jusqu'alors dans 26 pays et avec un taux de mortalité de 42%, soulève de nouveau l'importance des coronavirus en santé publique (Alsahafi et Cheng, 2016).

Les études épidémiologiques ont confirmé l'origine zoonotique des virus du SRAS-CoV et du MERS-CoV, attribuée à la civette et au dromadaire respectivement (Guan *et al.*, 2003; Haagmans *et al.*, 2014). Dans le cas du SRAS, le réservoir original du virus a été détecté chez le rhinolophe (*Rhinolophus* sp.) (Li *et al.*, 2005). Une souche apparentée au MERS-CoV a également été isolée chez une sérotine (*Neoromicia capensis*) (Corman *et al.*, 2014).

Depuis la pandémie du SRAS, de nombreuses souches de CoVs ont été découvertes chez une multitude d'espèces de chiroptères, et notamment en Asie. Peu d'études ont cependant été effectuées chez ces hôtes au Cambodge et aucune au Laos, deux pays qui présentent une très forte diversité de chiroptères et de nombreuses interfaces entre les Hommes et ces hôtes. Le partage du même environnement, la chasse et la consommation de chiroptères ainsi que le ramassage du guano y sont des pratiques répandues. Au Cambodge, deux virus appartenant à la famille des *Flaviridae* et des *Bunyaviridae* ont été isolés chez deux espèces de chiroptères frugivore (*Cynopterus brachyotis*) (Salaün *et al.*, 1974) et insectivore (*Chaerephon plicata*) respectivement (Osborne *et al.*, 2003). Des études sérologiques démontrent également la circulation de lyssavirus (Cattoli *et al.*, 2012) et du

virus Nipah (Olson *et al.*, 2002; Reynes *et al.*, 2005) sans qu'aucun cas humain n'ait été rapporté. Des coronavirus ont été récemment décrits chez les chiroptères dans les pays voisins, en Thaïlande et au Sud-ouest de la Chine (Tang *et al.*, 2006; Wacharapluesadee *et al.*, 2013, 2015b), mais leur présence n'a jusqu'alors jamais été recherchée au Cambodge ni au Laos.

Notre étude a pour but de détecter la présence de coronavirus chez les chiroptères dans ces deux pays ainsi que de caractériser les souches circulant chez ces hôtes. Cette étude a été effectuée à partir des échantillons collectés lors du projet PREDICT entre 2011 et 2013 à partir d'animaux fraîchement morts et destinés à la consommation humaine. Des échantillons prélevés par l'IPC en 2010 sur des chiroptères capturés dans leurs milieux naturels au Nord du Cambodge (provinces de Preah Vihear, Stung Treng et Ratanakiri) ont aussi été intégrés. Les écouvillons rectaux collectés ont été testés par diagnostic moléculaire basé sur l'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) d'une portion conservée du gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Ce test utilise des amorces dégénérées, capables de détecter un large spectre de coronavirus chez les chiroptères. L'analyse des séquences obtenues a permis de typer les souches détectées et connaître leurs positions par rapport à des virus zoonotiques ou pathogènes pour l'Homme, déjà caractérisés. Cette étude permet également de mettre en lumière la distribution de ce virus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos.

Principaux résultats

Lors de cette étude, 1965 chiroptères appartenant à 16 genres et 5 familles (*Emballurionidae*, *Vespertilionidae*, *Pteropodidae*, *Rhinolophidae* et *Hipposideridae*) ont été testés. Une grande diversité de coronavirus (n=93) a été détectée chez 4 familles et 10 genres

de chiroptères frugivores et insectivores. Les analyses de séquences ont démontré la présence de 37 alpha-CoVs (α CoVs) et 56 beta-CoVs (β CoVs). Au sein de ces groupes, les séquences détectées se regroupent dans 3 et 2 clusters distincts respectivement. Trois réservoirs ont également été mis en évidence lors de cette étude : il s'agit de deux chiroptères nectarivores et une espèce insectivore: *Megaerops niphanae*, *Macroglossus* sp. et *Myotis horsfieldii*. Ceci souligne l'importance des chiroptères en tant que réservoirs de virus et la nécessité d'explorer ces hôtes mammifères.

Parmi les 93 chiroptères testés positifs, 4 ont été collectés directement dans des habitations, 75 sont des animaux chassés qui ont été prélevés sur des marchés (n = 43) ou dans des restaurants (n = 32). Un animal provient d'une ferme spécialisée dans la récolte de guano, et 13 ont été capturés dans leur milieu naturel par l'IPC. Nous avons ainsi prouvé que les chiroptères aux interfaces avec l'Homme présentent des CoVs.

D'une manière générale, une bonne corrélation entre la phylogénie des chiroptères et celle des coronavirus détectés est observée. C'est le cas par exemple des β CoVs du sous groupe D tous détectés chez des chauves-souris de la famille des Ptéropodidés, et les α CoVs, majoritairement détectés chez les chiroptères insectivores appartenant à la famille des *Yangochiroptera*.

Parmi les coronavirus détectés, 89 sont apparentés à des α CoVs et β CoVs isolés jusqu'alors, exclusivement chez des chiroptères (groupes α CoV-1, α CoV-4, β CoV-D), ce qui laisse penser que le risque de transmission à l'Homme paraît, *a priori*, limité pour ces souches. Néanmoins, un coronavirus apparaît génétiquement lié au sous-groupe C des β CoVs, qui inclut également le MERS-CoV et des souches HKU4 et HKU5 isolées chez d'autres chiroptères. Cette séquence a été détectée chez une pipistrelle (*Pipistrellus comorandra*) dans la province du Mondulkiri au Cambodge. De plus, un α CoV détecté chez

deux murins communs asiatiques (*Myotis horsfieldii*) dans la province cambodgienne de Kampong Chhnang est génétiquement associé aux coronavirus PEDV-CoV (Porcine Epidemic Diarrhea virus), responsables de diarrhée épidémique qui touche les élevages porcins.

Ces chauves-souris anthropophiles sont consommées régulièrement par les habitants de ces zones. La détection chez ces deux espèces de coronavirus génétiquement liés à des souches infectant d'autres espèces mammifères ou ayant un potentiel zoonotique reconnu, souligne que le risque de passage de la barrière d'espèce lors des activités de chasse et consommation de ces animaux, existe et nécessite d'être investigué.

ARTICLE

-Manuscrit de l'article soumis le 1er Août 2016 au journal Infections, Genetics and Evolution

-Travail présenté sous forme de communication orale et de poster:

- Présentation orale “Detection of coronaviruses in bat in Cambodia and Lao PDR”:
 - 12^{ème} congrès international sur l'épidémiologie moléculaire et la génétique évolutive des maladies infectieuses (MEEGID), 10-13 décembre 2014, Bangkok, Thaïlande.
(Prix de la meilleure communication étudiante)
 - Symposium scientifique international, Réseau International des Instituts Pasteur, 14-16 octobre 2015, Paris, France.
- Poster “Detection of coronaviruses in bat in Cambodia and Lao PDR” ([Annexe 3](#))
 - 64^{ème} meeting annuel de l'ASTMH (American Society of Tropical Medicine and Hygiene), 25-29 octobre 2015, Philadelphie, USA.

Manuscript Number:

Title: Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia

Article Type: Research paper

Keywords: Coronaviruses, Bats, Genetic diversity, Cambodia, Lao PDR

Corresponding Author: Dr Roger Frutos,

Corresponding Author's Institution: Cirad

First Author: Audrey Lacroix

Order of Authors: Audrey Lacroix; Veasna Duong; Vibol Hul; San Sorn; Davun Hull; Keo Omaliss; Sokha Chea; Alexandre Hassanin; Watthana Theppangna; Soubanh Silithammavong; Aneta Afelt; Zoe Greatorex; Amanda Fine; Tracey Goldstein; Lucy Keatts; Roger Frutos; Philippe Buchy

Abstract: South-East Asia is a hot spot for emerging zoonotic diseases, and bats have been recognized as hosts for a large number of zoonotic viruses such as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronaviruses, responsible for acute respiratory syndrome outbreaks. Hence, the importance to identify viruses present in bats which may represent a risk to humans. Coronaviruses (CoVs) have been reported in bat species from Thailand, China, Indonesia, Taiwan and the Philippines, but work to date has not focused in Cambodia or Lao PDR. Between 2010 and 2013, 1965 bats were collected at interfaces with human populations in these two countries. They were tested for the presence of coronavirus by consensus reverse transcription-PCR assay. A total of 93 samples (4.7%) from 17 genera of bats tested positive. Phylogenetic analyses of the sequences revealed the presence of potentially 37 alpha-coronavirus (α CoV) strains and 56 beta-CoV (β CoV) strains. The β CoVs group is known to include some coronaviruses highly pathogenic to human, such as SARS-CoV and MERS-CoV. All coronavirus sequences generated from frugivorous bats (family Pteropodidae) (n=55) clustered with other bat β CoVs of lineage D, whereas one coronavirus from *Pipistrellus* sp. fell in the lineage C of β CoVs which also includes the MERS-CoV. α CoVs were all detected in various genera of insectivorous bats and clustered with diverse bat α CoV sequences previously published. A closely related strain of PEDV, responsible for severe diarrhea in pigs (PEDV-CoV), was detected in 2 *Myotis* bats. We highlighted the presence and the high diversity of coronaviruses circulating in bats from Cambodia and Lao PDR. Three novel bat genera and species were identified as host of coronaviruses, namely *Macroglossus* sp., *Megaerops niphanae* and *Myotis horsfieldii*.

Suggested Reviewers: Malik Peiris PhD

Prof, Hong Kong University

malik@hkucc.hku.hk

Specialist of viral infectious diseases and coronavirus in South East Asia

Lin-Fa Wang
Prof, Duke-National University of Singapore
linfa.wang@duke-nus.edu.sg
Specialist of coronavirus and emerging viral diseases

Jordi Serra Cobo
Prof, University of Barcelona
serracobo@areambiental.com
Specialist of bat-borne diseases

Jan Felix Dressler
Prof, University of BonnUniversity of Bonn Medical Centre
drexler@virology-bonn.de
Specialist of viral infectious diseases and coronavirus

Dear Editor-in-Chief,

Following the presentation of Audrey Lacroix during the 12th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, in Bangkok the 12th December 2014, we would like to submit the related manuscript entitled: **“Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia”** for publication in *Infection, Genetics and Evolution*. The first author is a PhD student who is going to defend this year and time is very important. We would therefore be very grateful if you could consider this manuscript on a fast track process.

Bats are known to be the natural reservoir for several emerging zoonotic viruses such as coronaviruses, including the strains responsible for acute respiratory syndrome outbreaks, i.e. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS). South-East Asia is a hot spot for emerging zoonotic diseases, and displays increasing numbers of interfaces between wildlife and humans, hence, the importance to identify viruses present in bat populations in this region. Coronaviruses (CoVs) have been reported in bat species from several Asian countries, but no study has been performed so far in bats from Cambodia or Lao PDR, where bat hunting and consumption, as well as guano farming are common, providing opportunities for human contamination. In this work, we assessed the circulation and the genetic diversity of coronaviruses in bats in these two countries.

Almost 2000 bats were collected at human interfaces between 2010 and 2013, and tested for the presence of coronavirus by molecular assay. We found 4.7% of positive bats from a large diversity (17 genera) of insectivorous and frugivorous bats, including three novel reservoirs of coronaviruses. We found a high diversity of sequences: 37 potential alpha-coronavirus (α CoV) strains and 56 beta-CoV (β CoV) strains. The latter group is known to include the pathogenic SARS-CoV and MERS-CoV strains. All coronavirus sequences generated from frugivorous bats (family *Pteropodidae*) clustered with other bat β CoV strains, and most of the sequences generated insectivorous bats, clustered with diverse bat α CoV strains. Interestingly, we found in a human-dwelling bat (*Pipistrellus* sp.) a coronavirus from the lineage C of β CoVs which also includes the MERS-CoV. One strain of PEDV, responsible for severe diarrhea in pigs (PEDV-CoV), was also detected in *Myotis* bats, also adapted to human environment.

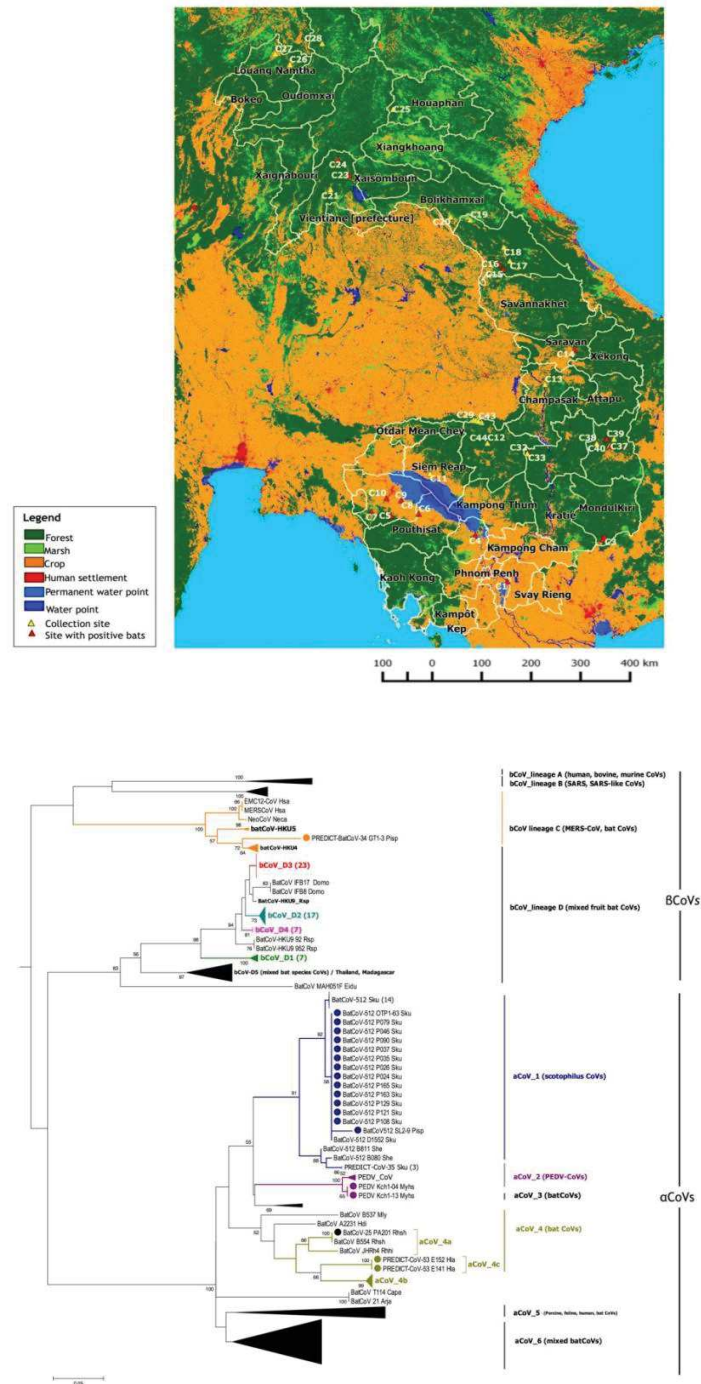
This is the first report of coronavirus detection in bat populations in Cambodia and Lao PDR. We brought the evidence that bats at the interface with human populations and meant to be consumed present a high diversity of CoVs. We also found CoV sequence closely related to pathogenic and zoonotic strains, which require specific attention. Further molecular epidemiological studies shed more light on those coronaviruses and help to estimate the potential zoonotic risk.

Thank you for your consideration of our manuscript.

Yours Sincerely,

Philippe Buchy (MD, PhD), Roger Frutos (PhD)

Graphical abstrat



Cover Letter

Dear Editor-in-Chief,

Following the presentation of Audrey Lacroix during the 12th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, in Bangkok the 12th December 2014, we would like to submit the related manuscript entitled: **“Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia”** for publication in *Infection, Genetics and Evolution*. The first author is a PhD student who is going to defend this year and time is very important. We would therefore be very grateful if you could consider this manuscript on a fast track process.

Bats are known to be the natural reservoir for several emerging zoonotic viruses such as coronaviruses, including the strains responsible for acute respiratory syndrome outbreaks, i.e. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS). South-East Asia is a hot spot for emerging zoonotic diseases, and displays increasing numbers of interfaces between wildlife and humans, hence, the importance to identify viruses present in bat populations in this region. Coronaviruses (CoVs) have been reported in bat species from several Asian countries, but no study has been performed so far in bats from Cambodia or Lao PDR, where bat hunting and consumption, as well as guano farming are common, providing opportunities for human contamination. In this work, we assessed the circulation and the genetic diversity of coronaviruses in bats in these two countries.

Almost 2000 bats were collected at human interfaces between 2010 and 2013, and tested for the presence of coronavirus by molecular assay. We found 4.7% of positive bats from a large diversity (17 genera) of insectivorous and frugivorous bats, including three novel reservoirs of coronaviruses. We found a high diversity of sequences: 37 potential alpha-coronavirus (α CoV) strains and 56 beta-CoV (β CoV) strains. The latter group is known to include the pathogenic SARS-CoV and MERS-CoV strains. All coronavirus sequences generated from frugivorous bats (family *Pteropodidae*) clustered with other bat β CoV strains, and most of the sequences generated insectivorous bats, clustered with diverse bat α CoV strains. Interestingly, we found in a human-dwelling bat (*Pipistrellus* sp.) a coronavirus from the lineage C of β CoVs which also includes the MERS-CoV. One strain of PEDV, responsible for severe diarrhea in pigs (PEDV-CoV), was also detected in *Myotis* bats, also adapted to human environment.

This is the first report of coronavirus detection in bat populations in Cambodia and Lao PDR. We brought the evidence that bats at the interface with human populations and meant to be consumed present a high diversity of CoVs. We also found CoV sequence closely related to pathogenic and zoonotic strains, which require specific attention. Further molecular epidemiological studies shed more light on those coronaviruses and help to estimate the potential zoonotic risk.

Thank you for your consideration of our manuscript.

Yours Sincerely,

Philippe Buchy (MD, PhD), Roger Frutos (PhD)

For **Infection, Genetics and Evolution**

Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia

Audrey Lacroix¹, Veasna Duong¹, Vibol Hul¹, Sorn San², Hull Davun², Keo Omaliss³, Sokha Chea⁴, Alexandre Hassanin⁵, Watthana Theppangna⁶, Soubanh Silithammavong⁶, Aneta Afelt⁷, Zoe Greateorex⁸, Amanda Fine⁹, Tracey Goldstein¹⁰, Lucy Keatts⁴, Roger Frutos^{11,12,#}, Philippe Buchy^{1,13#}

- 1) Institut Pasteur du Cambodge, Virology Unit, Phnom Penh, Cambodia
- 2) National Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Cambodia
- 3) Forest Administration, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Cambodia
- 4) Wildlife Conservation Society, Cambodia
- 5) Muséum national d'Histoire naturelle, Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), UMR 7205 MNHN CNRS UPMC, France
- 6) National Animal Health Laboratory, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Lao PDR
- 7) Institute of Physical Geography, Faculty of Geography and Regional Studies, University of Warsaw, Warsaw, Poland
- 8) Wildlife Conservation Society, PDR Lao
- 9) Associate Director – Asia, Wildlife Health & Health Policy Program, Wildlife Conservation Society (WCS) - Viet Nam Program, Hanoi, Vietnam
- 10) One Health Institute, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, USA
- 11) Cirad, UMR 17, Cirad-Ird, TA-A17/G, Montpellier, France
- 12) Université de Montpellier, IES, UMR 5214, CNRS-UM, Montpellier, France
- 13) GSK Vaccines R&D, 150 Beach road, # 22-00, 189720 Singapore

Address correspondence to

Roger Frutos

Email: roger.frutos@ies.univ-montp2.fr

Philippe Buchy

Email: buchyphilippe@hotmail.com

Running title: Coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia

Keywords: Coronaviruses, Bats, Genetic diversity, Cambodia, Lao PDR

Highlights

- 1) Coronaviruses detected in bats from Lao PDR and Cambodia.
- 2) High diversity of α CoVs and β CoVs circulating in bats.
- 3) One strain of β CoV genetically related to MERS-CoV lineage, detected from *Pipistrellus* sp.
- 4) A α CoV strain genetically related to PEDV-CoV, detected from *Myotis horsfieldii*.
- 5) CoVs detected for the first time in diverse bats species and genus, *i.e.* *Megaerops niphanae*, *Myotis horsfieldii* and *Macroglossus* sp.

Abstract

South-East Asia is a hot spot for emerging zoonotic diseases, and bats have been recognized as hosts for a large number of zoonotic viruses such as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronaviruses, responsible for acute respiratory syndrome outbreaks. Hence, the importance to identify viruses present in bats which may represent a risk to humans. Coronaviruses (CoVs) have been reported in bat species from Thailand, China, Indonesia, Taiwan and the Philippines, but work to date has not focused in Cambodia or Lao PDR. Between 2010 and 2013, 1965 bat were collected at interfaces with human populations in these two countries. They were tested for the presence of coronavirus by consensus reverse transcription-PCR assay. A total of 93 samples (4.7%) from 17 genera of bats tested positive. Phylogenetic analyses of the sequences revealed the presence of potentially 37 alpha-coronavirus (α CoV) strains and 56 beta-CoV (β CoV) strains. The β CoVs group is known to include some coronaviruses highly pathogenic to human, such as SARS-CoV and MERS-CoV. All coronavirus sequences generated from frugivorous bats (family *Pteropodidae*) (n=55) clustered with other bat β CoVs of lineage D, whereas one coronavirus from *Pipistrellus* sp. fell in the lineage C of β CoVs which also includes the MERS-CoV. α CoVs were all detected in various genera of insectivorous bats and clustered with diverse bat α CoV sequences previously published. A closely related strain of PEDV, responsible for severe diarrhea in pigs (PEDV-CoV), was detected in 2 *Myotis* bats. We highlighted the presence and the high diversity of coronaviruses circulating in bats from Cambodia and Lao PDR. Three novel bat genera and species were identified as host of coronaviruses, namely *Macroglossus* sp., *Megaerops niphanae* and *Myotis horsfieldii*

1. Introduction

Coronaviruses (CoVs) are enveloped, single stranded positive-sense RNA viruses displaying a large genome of 26 kb to 32 kb (Masters, 2006). They are classified within 4 groups based on genotype and serological characteristics: *alphacoronaviruses* (α CoVs), *betacoronaviruses* (β CoVs), *gammacoronaviruses*, and the recently created group of the *deltacoronaviruses* (Woo *et al.*, 2009, 2012). Their host range is very wide and includes both mammalian and avian species. Coronaviruses can cause acute and chronic respiratory, enteric, neurological and hepatic diseases in their hosts (Weiss and Navas-Martin, 2005). Coronaviruses of animal origin were responsible for the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) outbreak in 2003-2004, which was associated with deaths in Hong Kong, China, South East Asia and North America (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003; Peiris *et al.*, 2003) and the current epidemics of MERS in the Arabian Peninsula (Alsaifi and Cheng, 2016) and Korea (Choi, 2015).

Bats have been identified as the natural reservoirs for several zoonotic viruses, such as henipaviruses (Chua *et al.*, 2000; Halpin *et al.*, 2000; Young *et al.*, 1996) lyssaviruses variants (Banyard *et al.*, 2014) and Ebola virus (Leroy *et al.*, 2005, 2009). Bats have been identified as the natural host of the SARS-CoV, (Wang *et al.*, 2006), and recently, a closely related CoV causing the Middle Eastern Respiratory Syndrome (MERS-CoV) was detected in a sub-Saharan bat (*Neoromicia capensis*) besides its camel host (Corman *et al.*, 2014). A growing number of coronaviruses have been detected in bats since the SARS-CoV outbreak (Anindita *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2008, 2006; Lau *et al.*, 2012, 2010, 2007; Tsuda *et al.*, 2012; Wacharapluesadee *et al.*, 2015, 2013; Watanabe *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 20016, Kim *et al.*, 2016)

including a high diversity of coronaviruses, recently detected in five Thai provinces neighboring Cambodia (Wacharapluesadee *et al.*, 2015, 2013).

The order Chiroptera represents approximately 20% of all living mammal species (Teeling *et al.*, 2005). Over 25% of the world's bat diversity is found in South-East Asia, established in many natural, urban and suburban environments (Kingston, 2013). Seventy species of bats have been described so far in Cambodia whereas ninety species are known in Lao PDR, including *Yangochiroptera* and *Yinpterochiroptera* (Matveev, 2005; Sarak *et al.*, 2013). Despite the protection of several species, bats are hunted for food or preparation of traditional medicines and are found in food markets throughout South-East Asia, save Singapore (Lee *et al.*, 2014; Mildenstein *et al.*, 2016). Bat farms, where bat guano is harvested to serve as fertilizer, are becoming common in South-East Asia, including in Cambodia (Thi *et al.*, 2014). Recently In Thailand, a coronavirus belonging to the lineage C betacoronaviruses was detected in bat guano (Wacharapluesadee *et al.*, 2013).

Due to evolving land-use such as deforestation, infrastructure development, urban development, and agricultural expansion, bat populations are settling in areas closer to human dwellings (Jung and Threlfall, 2016), increasing the likelihood of contact between bats and humans. Socio-economic-driven changes of the environment are also impacting the bats and thus may affect virus biodiversity (Brierley *et al.*, 2016; Looi and Chua, 2007; Turmelle and Olival, 2009). These factors may also contribute to an increased occurrence of contacts between bats and humans. This in turn may increase the potential transmission of zoonotic pathogens, including a coronaviruses. Despite the prolificacy of such interfaces in the region, so far no study has been conducted on bat coronaviruses in Cambodia and Lao PDR.

To our knowledge, this is the first study to investigate the presence and the diversity of coronaviruses in bats in Cambodia and Lao PDR.

2. Materials and methods

2.1. Ethics. The study was approved by the National Veterinary Research Institute and Forest Administration department of the Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries in Cambodia, as well as by the National Animal Health Laboratory of the Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, in Lao PDR, and under the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of California, Davis (protocol number: 16048).

2.2. Collection of bat samples. Bat samples from various species were collected from different locations in Lao PDR and Cambodia, over a 3-year period (from November 2010 to December 2013). Bat species were identified to genus or species by trained biologists and veterinarians. The sampling was performed in two phases: Phase 1 was carried out in 2010 by the Institut Pasteur in Cambodia (IPC) and the *Muséum national d'Histoire naturelle* (MNHN; Paris, France). Bats were captured and humanely euthanized in order to collect skulls and tissues for zoological and genetic research on Asian bats. The capture sites were located in Ratanakiri and Preah Vihear provinces in Cambodia. Rectal swabs were stored in viral transport medium solution (VTM; containing tryptose phosphate Broth 2.95%, 145 mM of NaCl, 5% gelatin, 54 mM Amphotericin B, 106 U of penicillin-streptomycine per liter, 80 mg of gentamycine per liter [Sigma-Aldrich, Irvine, UK]). Tissue specimens (*i.e.* lung, liver, spleen, kidney, heart) were placed in separate cryotubes. All specimens were immediately transferred into liquid nitrogen containers before being transported to the Institut Pasteur laboratory where they were stored at -80°C prior to testing. The second sampling phase was performed by the Wildlife Conservation Society (WCS) from 2011 to 2013. No animals were killed for the purpose of the study and all samples were collected from freshly dead bats found in food markets. Rectal swabs were collected and

immediately placed in VTM or RNAlater[®] (Qiagen). Specimens collected in VTM were immediately stored in liquid nitrogen before being transported to the laboratory and stored at -80°C prior to testing.

2.3. RNA extraction and nested-RT-PCR. Viral RNA was extracted using the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the supplier's instructions. Reverse transcripton (RT) was performed using SuperScript III (Invitrogen, San Diego, CA). The PCR mixture (final volume: 25 µl) contained 2 µl of cDNA, PCR buffer (50mM Tris-HCl (pH 9.0); 50 mM NaCl; 5mM MgCl₂), 200 µM (each) deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 20 pmol of each primer targeting the RdRp gene (primers modified de Souza Luna *et al.*, 2007; Supplementary table 1), and 1U of HOT FIREPol[®] DNA Polymerase (Solis BioDyne, Tartu, Estonia). The PCR mixture was incubated at 95°C for 12 min, followed by 35 cycles at 95°C for 30 sec, 50°C for 30 sec, and 72°C for 1 min, and by a final extension at 72°C for 5 min. A nested PCR amplification using forward primer CoV-Fwd2 and the same reverse primer, was performed on 1 µl of the primary PCR products, using the same amplification conditions. The amplification of sequences specific to CoVs was attested by the visualization of a 440 bp and a 434 bp fragment after the first and second PCR round, respectively. To limit the risk of contamination, RNA extraction, reverse transcription-PCR (RT-PCR), nested-PCR and gel electrophoresis were carried out in separate rooms. In addition, negative controls (water) were included in each run of the nested-RT-PCR assay and results were validated only if these controls tested negative while the positive controls (plasmids prepared by cloning the gene of interest) had to test positive. Amplified product were sequenced in both directions by direct Sanger sequencing in commercial facilities (Macrogen, Inc., Seoul, Korea). Sequence data were deposited in GenBank and accession numbers are provided in Supplementary Table 2. Since many coronaviruses from

different bat genera were detected, and for the sake of clarity, a short name of the strain, the sample code, and the host classification were abbreviated to be used in the sequence nomenclature (Supplementary Table 2). For example, the sequence "Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0109", corresponding to the Bat coronavirus 512/2005 strain (BatCoV-512), detected in the sample KHP13-PTR1-0109 (P109), from a *Scotophilus kuhlii* (Sku) was abbreviated as: BatCoV-512_P109_Sku. The abbreviations used to code the bat classification, are listed in the Supplementary Table 3.

2.4. Sequence analysis. Sequences were analyzed using CLC Genomics Workbench version 3.6.1 and BioEdit, version 7.0.9.1. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Sequences were aligned with a representative set of CoV sequences retrieved from GenBank using Seaview, version 4.5.4 (Gouy *et al.*, 2010). Phylogenetic trees based on RNA sequences were constructed using the Maximum Likelihood method with the GTR + G + I model and bootstrap values (BP) were calculated after 1,000 replicates. Phylogenetic trees based on protein sequences were constructed using the neighbor joining method and bootstrap values were calculated after 1,000 replicates. Host phylogenetic analysis was performed using 330 amino acid sequences of mitochondrial cytochrome b gene found in GenBank database. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using Seaview version 4.5.4.

2.5. Geographic data. Land cover data was obtained from GlobeLand30 service operated by the National Geomatics Center of China (NGCC, 2014). Initial data was produced in 2010 with an update in 2014. Images used for GlobeLand30 (GLC30) classification were multispectral images with a 30-meter resolution. Six classes of land cover were presented: crop land, forest, grassland,

wetland, water bodies and settlement area. Data mapping was conducted with Quantum GIS, version 2.8.2. Due to confidentiality agreements, the exact location of markets and hunting areas is not available and only the name of the corresponding districts is given.

3. Results

3.1. Sampling areas and sample collection

A total of 1965 bats were sampled in 44 locations from nine provinces in Cambodia and eight provinces in Lao PDR (Figure 1). The characteristics of the environments around sampling site are described in Table 1. Bats originating from 5 districts (*i.e.* the Kasi, Kean Svay, Vang Vieng, Choam Khsant and Moung Russei districts) represented 60% of all the bats collected. Bats were live captures during the phase 1 (n=322), hunted by villagers and sampled in markets (n=1636) or from bats living in guano farms (n=7) during the phase 2 (Table 1). Apart from bats trapped during phase 1 or animals sampled in a guano farm (site reference C6, see Table 1) during phase 2, the exact location where the animals were captured remained imprecise. Nevertheless the chiroptera were always captured by hunters in areas close to places where the animal specimens were collected, *i.e.* mostly in areas at the border of deep forests, in mixed agricultural zones with sparse forests, in suburban zones close to sparse forest, in natural protected forest areas, in places close to water surfaces or in limestone karst areas with mountain forests (Figure 1, Table 1).

3.2. Identification and phylogeny of collected bats

The 1965 animals were collected from chiroptera of 17 different genera and 5 families. Eighty percent of the samples belonged to 2 bat families only, the *Vespertilionidae* (n=456) and the *Pteropodidae* (n=1124) families, which were found in 8/27 and 18/27 districts, respectively (Table 2). In Lao PDR, 95.7% of the samples belonged to the *Yinpterochiroptera* suborder, including families *Pteropodidae* (78.1%), *Hipposideridae* (6.3%), and *Rhinolophidae* (11.3%) while only 4.3% were *Yangochiroptera* suborder from the family *Vespertilionidae*. In Cambodia,

35% of the bats collected belonged to suborder *Yinpterochiroptera*), and suborder *Yangochiroptera* accounted for the remainder of the collected samples (75%), including families *Emballurionidae* and *Vespertilionidae*. The natural landscapes surrounding the collection points correlated with the biology and ecology of the bats (Table 2). Pteropodids and vespertilionids, known to roost in caves (*Eonycteris* or *Rousettus*, and *Ia* respectively), were collected close to karst areas in Lao PDR. In Cambodia, the *Yinpterochiroptera* bats belonged to 5 genera of pteropodids known to mostly live in trees (*Cynopterus*, *Macroglossus*, *Megaerops*, *Pteropus*, *Rousettus*). Phylogenetic analyses based on 330 amino acid sequences of cytochrome b genes showed that *Pteropodidae* from the genera *Cynopterus*, *Macroglossus*, *Megaerops*, *Pteropus*, *Rousettus* formed a monophyletic group within the *Yinpterochiroptera* suborder (Supplementary Figure 1). The cluster comprising the *Vespertilionidae*, *Emballurionidae*, *Molossidae* and *Phyllostomidae* bats, known to be insectivorous in South East Asia, formed the *Yangochiroptera* sub-order (Supplementary Figure 1).

3.3. Coronaviruses phylogenetic analyses

Coronavirus RNA was detected in 93 bats (4.7%) out of 1965 animals tested. The phylogenetic analysis based on the corresponding sequences and 170 reference sequences from GenBank indicated that 37 sequences belonged to the α CoV genus while the 56 others fell into the β CoV genus (Figure 2). Out of the 56 bat- β CoVs, 55 belonged to the lineage D. The remaining strain detected (PREDICT-CoV-34_GT1-3_Pisp) belonged to the lineage C which comprises MERS-CoV and MERS-CoV-related viruses. The 55 lineage D bat- β CoVs clustered into three sublineages (D1, D2 and D3) out of the four sublineages identified in this group D (Figure 2). The sublineage D1 (BP=100) comprised 6 different β CoVs, 3 sequences from Lao

PDR and 3 from Cambodia. The sublineage D2 (BP= 73), contained 17 β CoVs detected from the Cambodian provinces of Preah Vihear, Stung Treng and Battambang. The sublineage D3 (BP= 45) contained the remaining 32 bat- β CoVs, which were mostly obtained from animals in Lao PDR (n=30) while only 2 were detected in bats from Cambodia.

The bat- α CoVs were unevenly distributed within three clusters (Figure 2). The α CoV_1 cluster included 32 sequences from Cambodian bats. The α CoV_2 cluster included two α CoVs from Cambodia, while the α CoV_4 cluster contained one sequence from Cambodia and two from Lao PDR. The same phylogenetic clustering was seen with analyses using the amino-acid sequences.

3.4. Identification and phylogeny of bats that tested positive for coronaviruses

Coronavirus RNA was detected in bats belonged to 10 distinct genera. The proportion of CoVs positive varied by bat genus (Table 2). The long-tongue fruit bat (*Macroglossus* sp.) had the highest proportion of positive bats for coronaviruses (14.3%). The proportion of positive bats varied by location, from 0% to 20.8% depending on the district where the animals were sampled (Table 2). The 37 α CoV-positive bats belonged to five genera of the *Yangochiroptera* suborder, *i.e.* *Rhinolophus* (n=1), *Myotis* (n=2), *Scotophilus* (n=31), *Pipistrellus* (n=1) and *Hipposideros* (n=2). A total of 56 animal tested positive for a β CoV, out of which 55 belonged to five genera of *Yinpterochiroptera* suborder, family *Pteropodidae*: *i.e.* *Rousettus* (n=25), *Cynopterus* (n=15), *Eonycteris* (n=10), *Macroglossus* (n=4), *Megaerops* (n=1) whereas the bat infected by the PREDICT-CoV-34 strain was a *Yangochiroptera* of the genus *Pipistrellus* (Figure 2).

3.5. Bats and coronaviruses phylogenetic congruence

A relatively good congruence was observed between bats and virus phylogenies. Only sequences from fruit bats from Cambodia and Lao PDR from the genera *Rousettus*, *Eonycteris*, *Macroglossus*, *Cynopterus* and *Megaerops* were found in the lineage D of β CoVs. In sublineage D1, two sequences from *Macroglossus* sp. from Cambodia (PREDICT-CoV-22 strains) and five viruses from *Eonycteris spelaea* from Lao PDR and Cambodia (PREDICT-CoV-22, R91, R77, R74, R58) were closely related to a CoV previously detected in an hipposiderid from Thailand (B629). Seventeen sequences were found in *Cynopterus* (PREDICT-CoV-24 strains, , R96, R75, R72, R65, R59, R71), *Rousettus* sp. and *Megaerops niphanae* (PREDICT-CoV-24) collected in Preah Vihear and Battambang in 2010 and 2013, respectively, clustered with others in the β CoV-D2 sublineage, and were closely related to CoVs previously detected in *Cynopterus sphinx* and *Hipposideros lekaguli* in South East Thailand. Similarly, the β CoV-D3 sublineage comprised 34 sequences found in *Rousettus*, *Eonycteris* and *Macroglossus* from Lao PDR (n=32) and Cambodia (n=2), and CoVs previously identified in pteropodids from Hong Kong, Kenya and Indonesia (genera *Rousettus* and *Dobsonia*). Additionally, the PREDICT-CoV-34 strain, detected in *Pipistrellus* sp., was more closely related to batCoV-HKU4 detected in *Tylonycteris* bats from Hong Kong (90% of nucleic acid and 95.2% of amino acid identities) than to other lineage C viruses found in *Pipistrellus* from Hong Kong, the Netherlands, Thailand, *Neoromicia* from South Africa and *Nycteris* from Ghana (82.4 to 84% of nucleic acid and 85.7% to 92.8% of amino acid identities respectively). Cluster α CoV_1 strains displayed a similar congruence profile and were only detected in Cambodian *Scotophilus* bats (n=31), with the exception of one sequence detected in Cambodian *Pipistrellus* (BatCoV512_SL2-9_Pisp). In the α CoV_4 cluster, two sequences found in *Hipposideros larvatus* (PREDICT-CoV-53 strains) from Lao PDR formed their own branch (cluster α CoV_4c), supported by a bootstrap of 100, closely related to the α CoV HKU10, previously detected in 5 bat genera from Thailand, the Philippines and Hong

Kong (sublineage α CoV_4b). Two α CoV sequences detected from *Myotis horsfieldii* in Cambodia, PEDV_Kch1-04 and PEDV_Kch1-13, fell with the CoV responsible for porcine epidemic diarrhea episodes in pigs (PEDV), in the cluster α CoV_2. They showed 93.4% to 97.2% nucleotide identity and 96.13% to 100% amino acid identity with the porcine CoV strains.

All sequences of viruses identified in *Scotophilus* clustered in the α CoV_1 lineage, those from *Hipposideros* belonged to α CoV_4c, the sequences found in *Myotis* were all from the group α CoV_2 and the sequences of the viruses identified in *Rousettus* were all grouped in the lineage β CoV_D. In *Pipistrellus* bats from Mondulkiri province caught in 2013, the viruses detected belonged to both the α CoV and the β CoV groups.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first report of the detection and description of coronaviruses from chiroptera of Cambodia and Lao PDR.

A significant diversity of CoVs was found in pteropodids both in Cambodia and Lao PDR. Overall, CoV detection rates (6.5% in Lao PDR and 4.85% in Cambodia) were in the same range than those found in Thailand (7%) (Wacharapluesadee *et al.*, 2015), but lower than those reported in Hong Kong (12%) or Philippines (29.6%) (Woo *et al.*, 2006; Tsuda *et al.*, 2012). Interestingly, for the first time, coronaviruses were detected in *Megaerops niphanae* and *Myotis horsfieldii*.

In this study, α CoVs were mostly associated with *Yangochiroptera* bats whereas β CoVs were found in *Yinpterochiroptera* bats, with the exception of three viruses, *i.e.*, 2 CoVs from the cluster α CoV_4 found in hipposiderids, and one β CoV from lineage C, detected in *Pipistrellus*. In Lao PDR, β CoVs from lineage D were all associated with pteropodids whereas α CoVs were detected from hipposiderids. In Cambodia, an association between host and virus clade was observed between bats from the genus *Myotis* and the α CoVs genetically related to PEDV strains. These results are in line with conclusions of previous studies: all CoVs detected in bats belonging to the *Myotis* genus were always α CoVs (August *et al.*, 2012; Dominguez *et al.*, 2007; Gloza-Rausch *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006; Kemensi *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2016).

β CoVs from lineage D have frequently been found in frugivorous bat species from Madagascar, Kenya, Thailand, and Hong Kong (Anindita *et al.*, 2015; Razanajatovo *et al.*, 2015; Wacharapluesadee *et al.*, 2015; Woo *et al.*, 2007). A similar trend was observed in this study, as

β CoVs from the lineage D were only affiliated with frugivorous bats. The phylogenetic relatedness of the genera *Cynopterus*, *Eonycteris*, *Rousettus*, *Megaerops* and *Macroglossus* suggests a possibility of coevolution of the lineage D β CoVs with the *Pteropodidae*.

However, the phylogeny data of our study should be interpreted with some caution given that they are based on short sequences of a conserved gene. Studies using longer sequence fragments that include other domains of the ORF would certainly provide new insights. Unfortunately sequencing of coronavirus can be challenging, due in part, to limited nucleic acid in field samples, as well as the high genetic diversity of the viruses (Drexler *et al.*, 2010; King *et al.*, 2012).

Although some findings in this study suggest the possibility of host specificity, in particular for the genera *Hipposideros*, *Myotis* and *Scotophilus*, as well as congruence of phylogeny between bats and coronaviruses, we also report shared hosts from different families for both α CoV and β CoV. For example, *Pipistrellus* bats from the same location were found to harbor α CoV_1 and lineage C β CoVs sequences. This latter lineage which also includes the highly pathogenic the MERS-CoV (Reusken *et al.*, 2016), have been from humans, camels, and insectivorous and frugivorous bats from the *Vespertilionidae* and *Phyllostomidae* families respectively (Annan *et al.*, 2013; Corman *et al.*, 2014; Reusken *et al.*, 2010; Wacharapluesadee *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014, Munster *et al.*, 2016).

Pipistrellus are human-dwelling bats and the presence of CoVs in the same clade with pathogenic viruses raises the question of the potential risk for human health resulting from deforestation and urbanization that creates habitats for these bats. In this study, *Pipistrellus* bats were found only in deforested and agricultural regions. Further risk-assessment studies should focus on the correlation between landscape change, land use and deforestation that may affect the

distribution of human-dwelling bats and therefore the coronaviruses they harbor. This risk in Cambodia might be worsened by the fact that *Pipistrellus* bats are hunted for food. Another related risk might be the development of guano farms, also associated to agriculture (Broadhead and Izquierdo, 2010; Stibig *et al.*, 2007). Bats reared for guano in Thailand have shown to harbor lineage C β CoV (Wacharapluesadee *et al.*, 2013). This activity is also developing in Cambodia (Thi *et al.*, 2014) and risk of contamination by direct contact and aerosols must therefore be considered.

The hypothesis of a potential case of horizontal transmission between livestock and bats can be raised with the PEDV-like viruses, detected in *Myotis horsfieldii*. Another α CoV closely related to PEDV-CoV was recently detected in Brazil in Mexican free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) (Simas *et al.*, 2015). Not only is this first report of the presence of this coronavirus in *Myotis horsfieldii*, but the strain detected seems genetically closely related to PEDV strains that infect swine and cattle (Song and Park, 2012). *Myotis* bats also belong to the *Vespertilionidae* family and dwell in dark places including houses, farms and barns. The hypothesis of a possible origin of PEDV from bats as well as a potential cross-species transmission has been raised by previous studies (Huang *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2006) and would benefit from further investigation. To date, only a limited number of studies have investigated the capacity of bat coronaviruses to be infectious to other mammals, including humans. This is notably due to a lack of data on the spike protein of these bat viruses. Indeed, the spike protein is the primary determinant for the cell tropism and pathogenesis (Belouzard *et al.*, 2012). Previous studies examining the role of spike proteins have focused on the SHC014 and the HKU4 bat coronaviruses, due to their close phylogenetic relationship with the highly pathogenic SARS-CoV and MERS-CoV. These two SARS-like and MERS-like bat coronaviruses experimentally demonstrated some potential to eventually emerge as human pathogens (Becker *et*

al., 2008; Menachery *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Recombinant viruses expressing the spike of SARS-like bat CoV (strain SHC014) can efficiently infect human airway cells as well as other mammal cells (primates, mice), and can undergo viral replication both *in vitro* and *in vivo* (Becker *et al.*, 2008; Menachery *et al.*, 2015). Sheahan *et al.* identified the two important mutations on the spike Receptor-Binding Domain (RBD) involved in the capacity of infection of human cells by bat SARS-like CoV strains (Sheahan *et al.*, 2008). Similarly, only two mutations (S746R and N762A) in the RBD region of spikes of the strain HKU4 are required to enhance the capacity to mediate viral entry into human cells of this MERS-like CoV strain (Yang *et al.*, 2015). Molecular interactions between the RBD of the spike protein of the viruses and the human receptors are important for the adaptation of SARS-CoV and MERS-CoV to human cells, and play a critical role in the bat-to-human transmission of coronaviruses (Li *et al.*, 2005; Menachery *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Hence, there is a clear need to study the gene encoding for the spike protein especially in the RBD region of bat coronaviruses in order to investigate their capacity to interact with human cell receptors and thus be potentially infectious to humans.

Our study had some limitations related to sampling procedure, that may have affected results. Many of the samples (n=1838) were collected from dead bats intended for human consumption. If rectal swab is the sample which represents the highest probability for detecting coronaviruses in bats (Watanabe *et al.*, 2010), it's possible virus survival in dead animals might be affected. And since the time between the death of the bats and sample collection remained unknown, we cannot exclude that viral genetic material quality may have decreased and may have negatively affected the detection rate by molecular assay. Moreover, although the samples were conserved in stabilization solution, several thaw cycles could have affected the quality of the biological material and the stability of the virus (Johnson, 1990). Thus, a loss of viral genetic

material could have happened leading to an undetectable viral load by PCR assay. Watanabe *et al.* used a quantitative real-time RT-PCR assay to estimate the viral load and established that the RT-PCR assay used in the present study had a threshold of detection of 5.3×10^4 copies per milligram of sample.

The health status of the animals sampled in our study was unknown but previous studies suggest that bats might not develop disease during coronavirus infections. Watanabe did not record any clinical symptoms during the experimental infection of by a β CoV belonging to the lineage D closely related to the CoVs detected here in the *Pteropodidae* (Watanabe *et al.*, 2010). Drexler observed a successful breeding in a colony of *Myotis myotis* bats despite a strong amplification of coronaviruses over time (Drexler *et al.*, 2011). Bats infected by SARS-CoV did not display any clinical symptoms (Wang *et al.*, 2006) while the virus was pathogenic for various mammal models such as civets, hamsters, ferrets, mice or primates (Wu *et al.*, 2005; Weiss and Navas-Martin, 2005). Studies on other zoonotic viruses showed results in the same line: bats can carry other RNA viruses, like henipaviruses (Halpin *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2000) or filoviruses (Jones *et al.*, 2015; E. M. Leroy *et al.*, 2005; Olival and Hayman, 2014; Swanepoel, 2007) without displaying clinical signs of infection. RNA viruses seem to have little pathogenic effect on bat's life cycle (Li *et al.*, 2005) which may explain that bats are excellent reservoirs for zoonotic viruses including CoVs (Brook and Dobson, 2015; Han *et al.*, 2015; Omatsu *et al.*, 2007).

Bats have developed metabolic processes adapted to wide variations in both temperature and metabolic rate during flight. Such metabolism has inadvertent consequences on their longevity and immune functioning (O'Shea *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013). More particularly,

chiropterans are able to modulate antiviral immune mechanisms to control intra-cellular infections (Brook and Dobson, 2015). Several studies showed that infected bats may not clear totally the virus, but they are able to maintain the infection to a very low viral load, avoiding immunopathogenic consequences. This strategy, combined with the capacity to spread the virus in relative long distances and diverse environments, make bats a very efficient reservoir of zoonotic pathogens (Schountz, 2014).

Although Chiroptera do well support infections by viruses, a seasonality has been shown in some zoonotic virus infection rates. Reproduction periods, female status and resource availabilities have been proven to affect the prevalence in bats infected by other RNA viruses, such as henipaviruses (Middleton *et al.*, 2007; Plowright *et al.*, 2008; Wacharapluesadee *et al.*, 2010), rhabdoviruses (George *et al.*, 2011) or filoviruses (Amman *et al.*, 2012; Hayman, 2015). Drexler also observed a strong amplification of RNA viruses including coronaviruses during a *Myotis myotis* colony formation and after parturition (Drexler *et al.*, 2010). Greater shedding over such periods increase the probability of transmission of viruses to humans and the risk of emerging zoonoses. Seasonality was not explored in our study due to the heterogeneity of the sampling session over time, but it would be interesting to include these parameters in further investigations.

The sample collection methodology did not allow a detailed epidemiological analysis of the circulation of CoVs in bats based on geographical origin. We observed a high heterogeneity in the number of specimens collected and in the diversity of the bats species in the study sites.

For example, 60% of the bat samples were collected in 13% (5/28) of the visited districts. Other parameters such as age, sex, pregnancy status could also not be readily recorded.

Almost all the bats which tested positive for coronaviruses were meant to be consumed by local human populations. The examples of Ebola or SARS-CoV outbreaks already suggest that wildlife hunting and consumption provided opportunities for human contamination (Bengis *et al.*, 2004, Leroy *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2004). In Cambodia and Lao PDR, bat consumption is widespread (Lee *et al.*, 2014; Mickleburgh *et al.*, 2009; Mildenstein *et al.*, 2016). These practices may increase the risk of human exposure to viruses through hosts that may be reservoirs for pathogens. Practices such as hunting, selling or cooking bats might represent efficient interfaces for virus transfer from bats to humans, and therefore need to be further investigated. It demonstrates the importance to develop guidance for rural communities exposed to bats, on how to deal with them and the potential virus threat.

The diversity of bat coronaviruses found circulating in Cambodia and Lao PDR suggests a correlation may exist between coronaviruses and host diversity. In Cambodia alone, 22% of the forest areas have been lost since 1973, while about 50% of the remaining surface is fragmented and 70% of the forest is in a “perforation” state in Lao PDR (WWF, 2013), associated with agricultural development and suburban growth. This environmental change most likely affects the biodiversity of bats and therefore that of their coronaviruses. As deforestation, agriculture and suburban growth might facilitate encounters between humans and coronaviruses from human-dwelling bats that could potentially become harmful for humans, specific attention and studies should therefore be devoted to this aspect.

5. Acknowledgements

This study was made possible by the generous support of the American people through the United States Agency for International Development (USAID) Emerging Pandemic Threats PREDICT project (cooperative agreement number GHN-A-OO-09-00010-00). We thank the governments of Cambodia and Laos for permission to conduct this study. We are grateful to the WCS teams and all students who helped collecting field samples. We also extend our gratitude to Dara Kong and Serey Roth Long for technical support in laboratory diagnostic. Authors are also grateful to Neil Furey, from the Center for Biodiversity Conservation of the Royal University of Phnom Penh, for his help and advice on species identification. We also thank Sarah Olson for her help with proof reading this document.

Conflict of interest

Philippe Buchy is currently an employee of GSK vaccines.

6. References

- Alsahafi, A.J., Cheng, A.C., 2016. The epidemiology of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the Kingdom of Saudi Arabia, 2012-2015. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 45, 1–4.
- Amman, B.R., Carroll, S.A., Reed, Z.D., Sealy, T.K., Balinandi, S., Swanepoel, R., Kemp, A., Erickson, B.R., Comer, J.A., Campbell, S., Cannon, D.L., Khristova, M.L., Atimnedi, P., Paddock, C.D., Crockett, R.J.K., Flietstra, T.D., Warfield, K.L., Unfer, R., Katongole-Mbidde, E., Downing, R., Tappero, J.W., Zaki, S.R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., Towner, J.S., 2012. Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002877.
- Anindita, P.D., Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Orba, Y., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H., Kimura, T., 2015. Detection of coronavirus genomes in Moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. *Arch. Virol.* 60, 1113-1118.
- Annan, A., Baldwin, H.J., Corman, V.M., Klose, S.M., Owusu, M., Nkrumah, E.E., Badu, E.K., Anti, P., Agbenyega, O., Meyer, B., Oppong, S., Sarkodie, Y.A., Kalko, E.K.V., Lina, P.H.C., Godlevska, E.V., Reusken, C., Seebens, A., Gloza-Rausch, F., Vallo, P., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J.F., 2013. Human Betacoronavirus 2c EMC/2012-related Viruses in Bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 456–459.
- August, T.A., Mathews, F., Nunn, M.A., 2012. Alphacoronavirus detected in bats in the United Kingdom. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 530–533.
- Banyard, A.C., Evans, J.S., Luo, T.R., Fooks, A.R., 2014. Lyssaviruses and Bats: Emergence and Zoonotic Threat. *Viruses* 6, 2974–2990.
- Becker, M.M., Graham, R.L., Donaldson, E.F., Rockx, B., Sims, A.C., Sheahan, T., Pickles, R.J., Corti, D., Johnston, R.E., Baric, R.S., Denison, M.R., 2008. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19944–19949.
- Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N., Whittaker, G.R., 2012. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4, 1011–1033.
- Bengis, R.G., Leighton, F.A., Fischer, J.R., Artois, M., Mörner, T., Tate, C.M., 2004. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev. Sci. Tech. - Off. Int. Épizooties* 23, 497–511.
- Brierley, L., Vonhof, M.J., Olival, K.J., Daszak, P., Jones, K.E., 2016. Quantifying Global Drivers of Zoonotic Bat Viruses: A Process-Based Perspective. *Am. Nat.* 187, E53-64.

Broadhead, J., Izquierdo, R., 2010. Assessment of land use, forest policy and governance in Cambodia. FAO-Regional Office for Asia and the Pacific, Thailand.

Brook, C.E., Dobson, A.P., 2015. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 23, 172–180.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003. Update: outbreak of severe acute respiratory syndrome--worldwide, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 52, 269–272.

Chen, Y.-N., Phuong, V.N., Chen, H.C., Chou, C.-H., Cheng, H.-C., Wu, C.-H., 2016. Detection of the Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus and Alphacoronavirus in the Bat Population of Taiwan. *Zoonoses Public Health*.

Choi, J.Y., 2015. An Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in South Korea, 2015. *Yonsei Med. J.* 56, 1174–1176.

Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Chan, K.H., H Chen, Guan, Y., Yuen, K.Y., Peiris, J.S.M., 2006. Coronaviruses in bent-winged bats (*Miniopterus* spp.). *J. Gen. Virol.* 87, 2461–2466.

Chu, D.K.W., Peiris, J.S.M., Chen, H., Guan, Y., Poon, L.L.M., 2008. Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J. Gen. Virol.* 89, 1282–1287.

Chua, K.B., Bellini, W.J., Rota, P.A., Harcourt, B.H., Tamin, A., Lam, S.K., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Zaki, S.R., Shieh, W., Goldsmith, C.S., Gubler, D.J., Roehrig, J.T., Eaton, B., Gould, A.R., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, A.E., Peters, C.J., Anderson, L.J., Mahy, B.W., 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288, 1432–1435.

Corman, V.M., Ithete, N.L., Richards, L.R., Schoeman, M.C., Preiser, W., Drosten, C., Drexler, J.F., 2014. Rooting the phylogenetic tree of Middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J. Virol.* 88, 11297–11303.

de Souza Luna, L.K., Heiser, V., Regamey, N., Panning, M., Drexler, J.F., Mulangu, S., Poon, L., Baumgarte, S., Haijema, B.J., Kaiser, L., Drosten, C., 2007. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1049–1052.

Dominguez, S.R., O’Shea, T.J., Oko, L.M., Holmes, K.V., 2007. Detection of Group 1 Coronaviruses in Bats in North America. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1295–1300.

Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., Corman, V.M., Muth, D., Goettsche, M., Seebens, A., Niedrig, M., Pfefferle, S., Yordanov, S., Zhelyazkov, L., Hermanns, U., Vallo, P., Lukashev, A., Müller, M.A., Deng, H., Herrler, G., Drosten, C., 2010. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-

related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 84, 11336–11349.

Drexler, J.F., Corman, V.M., Wegner, T., Tateno, A.F., Zerbinati, R.M., Gloza-Rausch, F., Seebens, A., Müller, M.A., Drosten, C., 2011. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 449–456.

Fischer, K., Zeus, V., Kwasnitschka, L., Kerth, G., Haase, M., Groschup, M.H., Balkema-Buschmann, A., 2016. Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany. *Infect. Genet. Evol.* 37, 108–116.

George, D.B., Webb, C.T., Farnsworth, M.L., O'Shea, T.J., Bowen, R.A., Smith, D.L., Stanley, T.R., Ellison, L.E., Rupprecht, C.E., 2011. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10208–10213.

Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Götsche, M., Panning, M., Drexler, J.F., Petersen, N., Annan, A., Grywna, K., Müller, M., Pfefferle, S., Drosten, C., 2008. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 626–631.

Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. (2010) SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution.* 27,221-224.

Halpin, K., Young, P.L., Field, H.E., Mackenzie, J.S., 2000. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.* 81, 1927–1932.

Han, H.-J., Wen, H., Zhou, C.-M., Chen, F.-F., Luo, L.-M., Liu, J., Yu, X.-J., 2015. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* 205, 1–6.

Hayman, D.T.S., 2015. Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. *Proc. Biol. Sci.* 282, 20142591.

Huang, Y.-W., Dickerman, A.W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., Meng, X.-J., 2013. Origin, Evolution, and Genotyping of Emergent Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains in the United States. *mBio* 4, 5 e00737-13.

Johnson, F.B., 1990. Transport of viral specimens. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 120–131.

Jones, M.E.B., Schuh, A.J., Amman, B.R., Sealy, T.K., Zaki, S.R., Nichol, S.T., Towner, J.S., 2015. Experimental Inoculation of Egyptian Rousette Bats (*Rousettus aegyptiacus*) with Viruses of the Ebolavirus and Marburgvirus Genera. *Viruses* 7, 3420–3442.

Jung, K., Threlfall, C.G., 2016. Urbanisation and Its Effects on Bats—A Global Meta-Analysis, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 13–33.

Kemenesi, G., Dallos, B., Görföl, T., Boldogh, S., Estók, P., Kurucz, K., Kutas, A., Földes, F., Oldal, M., Németh, V., Martella, V., Bányai, K., Jakab, F., 2014. Molecular survey of RNA viruses in hungarian bats: discovering novel astroviruses, coronaviruses, and caliciviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 14, 846–855.

Kim, H.K., Yoon, S.-W., Kim, D.-J., Koo, B.-S., Noh, J.Y., Kim, J.H., Choi, Y.G., Na, W., Chang, K.-T., Song, D., Jeong, D.G., 2016. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome-Like, Middle East Respiratory Syndrome-Like Bat Coronaviruses and Group H Rotavirus in Faeces of Korean Bats. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, 365–372.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., Carstens, E.B., 2012. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier.

Kingston, T., 2013. Response of Bat Diversity to Forest Disturbance in Southeast Asia: Insights from Long-Term Research in Malaysia, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), *Bat Evolution, Ecology, and Conservation.* Springer New York, pp. 169–185.

Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Y., Wang, M., Lam, C.S.F., Xu, H., Guo, R., Chan, K.-H., Zheng, B.-J., Yuen, K.-Y., 2007. Complete genome sequence of bat coronavirus HKU2 from Chinese horseshoe bats revealed a much smaller spike gene with a different evolutionary lineage from the rest of the genome. *Virology* 367, 428–439.

Lau, S.K.P., Poon, R.W.S., Wong, B.H.L., Wang, M., Huang, Y., Xu, H., Guo, R., Li, K.S.M., Gao, K., Chan, K.-H., Zheng, B.-J., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., 2010. Coexistence of Different Genotypes in the Same Bat and Serological Characterization of Roussettus Bat Coronavirus HKU9 Belonging to a Novel Betacoronavirus Subgroup. *J. Virol.* 84, 11385–11394.

Lau, S.K.P., Li, K.S.M., Tsang, A.K.L., Shek, C.-T., Wang, M., Choi, G.K.Y., Guo, R., Wong, B.H.L., Poon, R.W.S., Lam, C.S.F., Wang, S.Y.H., Fan, R.Y.Y., Chan, K.-H., Zheng, B.-J., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., 2012. Recent transmission of a novel alphacoronavirus, bat coronavirus HKU10, from Leschenault's rousettes to pomona leaf-nosed bats: first evidence of interspecies transmission of coronavirus between bats of different suborders. *J. Virol.* 86, 11906–11918.

Lee, T.M., Sigouin, A., Pinedo-Vasquez, M., Nasi, R., 2014. The harvest of wildlife for bushmeat and traditional medicine in East, South and Southeast Asia: Current knowledge base, challenges, opportunities and areas for future research. Center for International Forestry Research (CIFOR), Bogor, Indonesia.

Leroy, E.M., Epelboin, A., Mondonge, V., Pourrut, X., Gonzalez, J.-P., Muyembe-Tamfum, J.-J., Formenty, P., 2009. Human Ebola Outbreak Resulting from Direct Exposure to Fruit Bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 9, 723–728.

Leroy, E., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J., Gonzalez, J.-P., Swanepoel, R., 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438, 575–576.

Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J.H., Moore, M.J., Luo, S., Wong, S.-K., Huang, I.-C., Xu, K., Vasilieva, N., Murakami, A., He, Y., Marasco, W.A., Guan, Y., Choe, H., Farzan, M., 2005. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24, 1634–1643.

Looi, L.-M., Chua, K.-B., 2007. Lessons from the Nipah virus outbreak in Malaysia. *Malays. J. Pathol.* 29, 63–67.

Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193–292.

Matveev, V.A., 2005. Checklist of Cambodian bats (Chiroptera), with new records and remarks on taxonomy. *Russian Journal of Theriology.* 1, 43–62.

Menachery, V.D., Yount, B.L., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L.E., Plante, J.A., Graham, R.L., Scobey, T., Ge, X.-Y., Donaldson, E.F., Randell, S.H., Lanzavecchia, A., Marasco, W.A., Shi, Z.-L., Baric, R.S., 2015. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 21, 1508–1513.

Mickleburgh, S., Waylen, K., Racey, P., 2009. Bats as bushmeat: a global review. *Oryx* 43, 217–234.

Middleton, D.J., Morrissy, C.J., van der Heide, B.M., Russell, G.M., Braun, M.A., Westbury, H.A., Halpin, K., Daniels, P.W., 2007. Experimental Nipah virus infection in pteropid bats (*Pteropus poliocephalus*). *J. Comp. Pathol.* 136, 266–272.

Mildenstein, T., Tanshi, I., Racey, P.A., 2016. Exploitation of Bats for Bushmeat and Medicine, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 325–375.

Munster, V.J., Adney, D.R., van Doremalen, N., Brown, V.R., Miazgowicz, K.L., Milne-Price, S., Bushmaker, T., Rosenke, R., Scott, D., Hawkinson, A., de Wit, E., Schountz, T., Bowen, R.A., 2016. Replication and shedding of MERS-CoV in Jamaican fruit bats (*Artibeus jamaicensis*). *Sci. Rep.* 6, 21878.

O’Shea, T.J., Cryan, P.M., Cunningham, A.A., Fooks, A.R., Hayman, D.T.S., Luis, A.D., Peel, A.J., Plowright, R.K., Wood, J.L.N., 2014. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 741–745.

Olival, K.J., Hayman, D.T.S., 2014. Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses* 6, 1759–1788.

Omatsu, T., Watanabe, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., 2007. Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, Special Issue: Recent research progress on emerging infectious diseases in Asia and Oceania 30, 357–374.

Osborne, C., Cryan, P.M., O'Shea, T.J., Oko, L.M., Ndaluka, C., Calisher, C.H., Berglund, A.D., Klavetter, M.L., Bowen, R.A., Holmes, K.V., Dominguez, S.R., 2011. Alphacoronaviruses in New World bats: prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans. *PloS One* 6, e19156.

Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K.S., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C.C., Chan, K.H., Tsang, D.N.C., Yung, R.W.H., Ng, T.K., Yuen, K.Y., SARS study group, 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 361, 1319–1325.

Plowright, R.K., Field, H.E., Smith, C., Divljan, A., Palmer, C., Tabor, G., Daszak, P., Foley, J.E., 2008. Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc. Biol. Sci.* 275, 861–869.

Razanajatovo, N.H., Nomenjanahary, L.A., Wilkinson, D.A., Razafimanahaka, J.H., Goodman, S.M., Jenkins, R.K., Jones, J.P., Heraud, J.-M., 2015. Detection of new genetic variants of Betacoronaviruses in Endemic Frugivorous Bats of Madagascar. *Virol. J.* 12, 42.

Reusken, C.B.E.M., Lina, P.H.C., Pielaat, A., de Vries, A., Dam-Deisz, C., Adema, J., Drexler, J.F., Drosten, C., Kooi, E.A., 2010. Circulation of group 2 coronaviruses in a bat species common to urban areas in Western Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 10, 785–791.

Reusken, C.B., Raj, V.S., Koopmans, M.P., Haagmans, B.L. 2016. Cross host transmission in the emergence of MERS coronavirus. *Curr. Opin. Virol.* 16: 55–62.

Sarak, C., Bates, P.J., Boughey, K., Csorba, G., Hayes, B., Saveng, I.T.H., Mould, A., Sophany, P., Furey, N.M., 2013. Further new country records of four bat species (Chiroptera) from Cambodia and a call for information. *Cambodian J. Nat. Hist.* 2, 73–82.

Schountz, T., 2014. Immunology of Bats and Their Viruses: Challenges and Opportunities. *Viruses* 6, 4880–4901.

Sheahan, T., Rockx, B., Donaldson, E., Sims, A., Pickles, R., Corti, D., Baric, R., 2008. Mechanisms of Zoonotic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Host Range Expansion in Human Airway Epithelium. *J. Virol.* 82, 2274–2285.

Simas, P.V.M., Barnabé, A.C. de S., Durães-Carvalho, R., Neto, D.F. de L., Caserta, L.C., Artacho, L., Jacomassa, F.A.F., Martini, M.C., Bianchi dos Santos, M.M.A., Felipe, P.A.N., Ferreira, H.L., Arns, C.W., 2015. Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 729–731.

Song, D., Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167–175.

Stibig, H.J., Stolle, F., Dennis, R., Feldkötter, C., 2007. Forest Cover Change in Southeast Asia-The Regional Pattern. JRC Sci. Tech. Rep. EUR 22896.

Swanepoel, R., 2007. Studies of Reservoir Hosts for Marburg virus. *Emerg. Infect. Dis.* Print Ed. 13, 1847–1851.

Tang, X.C., Zhang, J.X., Zhang, S.Y., Wang, P., Fan, X.H., Li, L.F., Li, G., Dong, B.Q., Liu, W., Cheung, C.L., Xu, K.M., Song, W.J., Vijaykrishna, D., Poon, L.L.M., Peiris, J.S.M., Smith, G.J.D., Chen, H., Guan, Y., 2006. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J. Virol.* 80, 7481–7490.

Teeling, E.C., Springer, M.S., Madsen, O., Bates, P., O'brien, S.J., Murphy, W.J., 2005. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307, 580–584.

Thi, S., Furey, N.M., Jurgens, J.A., 2014. Effect of bat guano on the growth of five economically important plant species. *J. Trop. Agric.* 52, 169–173.

Tsuda, S., Watanabe, S., Masangkay, J.S., Mizutani, T., Alviola, P., Ueda, N., Iha, K., Taniguchi, S., Fujii, H., Kato, K., Horimoto, T., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., Akashi, H., 2012. Genomic and serological detection of bat coronavirus from bats in the Philippines. *Arch. Virol.* 157, 2349–2355.

Turmelle, A.S., Olival, K.J., 2009. Correlates of Viral Richness in Bats (Order Chiroptera). *Ecohealth* 6, 522–539.

Wacharapluesadee, S., Boongird, K., Wanghongsa, S., Ratanasetyuth, N., Supavonwong, P., Saengsen, D., Gonggal, G.N., Hemachudha, T., 2010. A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in *Pteropus lylei* bats in Thailand: evidence for seasonal preference in disease transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 183–190.

Wacharapluesadee, S., Sintunawa, C., Kaewpom, T., Khongnomnan, K., Olival, K.J., Epstein, J.H., Rodpan, A., Sangsri, P., Intarut, N., Chindamporn, A., Suksawa, K., Hemachudha, T., 2013. Group C betacoronavirus in bat guano fertilizer, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1349–1351.

Wacharapluesadee, S., Duengkae, P., Rodpan, A., Kaewpom, T., Maneeorn, P., Kanchanasaka, B., Yingsakmongkon, S., Sittidetboripat, N., Chareesaen, C., Khlangsap, N., Pidthong, A., Leadprathom, K., Ghai, S., Epstein, J.H., Daszak, P., Olival, K.J., Blair, P.J., Callahan, M.V., Hemachudha, T., 2015. Diversity of coronavirus in bats from Eastern Thailand. *Virol. J.* 12, 57.

Wang, L.-F., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., 2006. Review of bats and SARS. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1834–1840.

Wang, Q., Qi, J., Yuan, Y., Xuan, Y., Han, P., Wan, Y., Ji, W., Li, Y., Wu, Y., Wang, J., Iwamoto, A., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., Yan, J., Lu, G., Gao, G.F., 2014. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host Microbe* 16, 328–337.

Watanabe, S., Masangkay, J.S., Nagata, N., Morikawa, S., Mizutani, T., Fukushi, S., Alviola, P., Omatsu, T., Ueda, N., Iha, K., Taniguchi, S., Fujii, H., Tsuda, S., Endoh, M., Kato, K., Tohya, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., Akashi, H., 2010. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1217–1223.

Weiss, S.R., Navas-Martin, S., 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 69, 635–664.

Williamson, M.M., Hooper, P.T., Selleck, P.W., Westbury, H.A., Slocombe, R.F., 2000. Experimental hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit Bats (*Pteropus poliocephalus*). *J. Comp. Pathol.* 122, 201–207.

Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Li, K.S.M., Poon, R.W.S., Wong, B.H.L., Tsoi, H., Yip, B.C.K., Huang, Y., Chan, K., Yuen, K., 2006. Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology* 351, 180–187.

Woo, P.C.Y., Wang, M., Lau, S.K.P., Xu, H., Poon, R.W.S., Guo, R., Wong, B.H.L., Gao, K., Tsoi, H.-W., Huang, Y., Li, K.S.M., Lam, C.S.F., Chan, K.-H., Zheng, B.-J., Yuen, K.-Y., 2007. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J. Virol.* 81, 1574–1585.

Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lai, K.K.Y., Huang, Y., Lee, P., Luk, G.S.M., Dyrting, K.C., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2009. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J. Virol.* 83, 908–917.

Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lau, C.C.Y., Tsang, A.K.L., Lau, J.H.N., Bai, R., Teng, J.L.L., Tsang, C.C.C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2012. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* 86, 3995–4008.

Wu, D., Tu, C., Xin, C., Xuan, H., Meng, Q., Liu, Y., Yu, Y., Guan, Y., Jiang, Y., Yin, X., Cramer, G., Wang, M., Li, C., Liu, S., Liao, M., Feng, L., Xiang, H., Sun, J., Chen, J., Sun, Y., Gu, S., Liu, N., Fu, D., Eaton, B.T., Wang, L.-F., Kong, X., 2005. Civets Are Equally Susceptible to Experimental Infection by Two Different Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Isolates. *J. Virol.* 79, 2620–2625.

WWF, 2013. Ecosystems in the Greater Mekong: past trends, current status, possible futures, World Wide Fund For Nature, Greater Mekong: Bangkok, Thailand.

Xu, R.-H., He, J.-F., Evans, M.R., Peng, G.-W., Field, H.E., Yu, D.-W., Lee, C.-K., Luo, H.-M., Lin, W.-S., Lin, P., Li, L.-H., Liang, W.-J., Lin, J.-Y., Schnur, A., 2004. Epidemiologic clues to SARS origin in China. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1030–1038.

Xu, L., Zhang, F., Yang, W., Jiang, T., Lu, G., He, B., Li, X., Hu, T., Chen, G., Feng, Y., Zhang, Y., Fan, Q., Feng, J., Zhang, H., Tu, C., 2016. Detection and characterization of diverse alpha- and betacoronaviruses from bats in China. *Viol. Sin.* 31, 69–77.

Yang, Y., Liu, C., Du, L., Jiang, S., Shi, Z., Baric, R.S., Li, F., 2015. Two Mutations Were Critical for Bat-to-Human Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* 89, 9119–9123.

Young, P.L., Halpin, K., Selleck, P.W., Field, H., Gravel, J.L., Kelly, M.A., Mackenzie, J.S., 1996. Serologic evidence for the presence in *Pteropus* bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 239–240.

Zhang, G., Cowled, C., Shi, Z., Huang, Z., Bishop-Lilly, K.A., Fang, X., Wynne, J.W., Xiong, Z., Baker, M.L., Zhao, W., Tachedjian, M., Zhu, Y., Zhou, P., Jiang, X., Ng, J., Yang, L., Wu, L., Xiao, J., Feng, Y., Chen, Y., Sun, X., Zhang, Y., Marsh, G.A., Crameri, G., Broder, C.C., Frey, K.G., Wang, L.-F., Wang, J., 2013. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science* 339, 456–460.

Table 1. Origin of the samples collected and environmental description around sampling sites.

Country	District (Province)	Reference of site	Date of sampling	Environment	Nb of bats sampled (% of all bats)	Origin of samples		
						Hunted/ sold on markets	Wild	Guano farm
Cambodia (Battambang)	Banan	C10	Nov, 11	Open areas with crops and sparse lowland forests	24 (1,2)	24	0	0
Cambodia (Battambang)	Moung Russei	C5/ C8, C9	May,2011, Jul, Aug, 2011 Sep, Nov, 2011	Open areas with crops close to sparse lowland forests, and water bodies	171 (8,7)	171	0	0
Cambodia (Battambang)	Som Lot	C7	Sept, 2012	Open areas with crops close to sparse lowland forest	7 (0,4)	7	0	0
Cambodia (Kampong Chhnang)	Kampong Chhnang	C4	Jun, 2011	Open areas with crops close to sparse lowland forest, and water bodies	50 (2,5)	50	0	0
Cambodia (Kandal)	Kean Svay	C1	May, Jun,2012, May, 2013	Suburban zone, areas with crops/sparse lowland forest, close to water bodies	392 (20)	392	0	0
Cambodia (Preah Vihear)	Choam Khsant	C29, C30, C41 C42, C43/ C12, C31, C44	Dec, 2010 Sep, 2012	Suburban zone close to sparse forest/ Areas close to forest	165 (8,4)	43	122	0
Cambodia (Pursat)	Bakan	C6	Jan, Feb 2013	Sparse lowland forests, bat farming	5 (0,3)	0	0	5
Cambodia (Ratanakiri)	Ou Chum	C36, C37	Dec, 2010	Close to water bodies and forest	45 (2,3)	45	0	0
Cambodia (Ratanakiri)	Ta Veang	C35	Dec, 2010	Small village close to forest	14 (0,7)	14	0	0
Cambodia (Ratanakiri)	Veun Sai	C38, C39	Dec, 2010	Human dwellings close to forest and water bodies	39 (2)	39	0	0

Cambodia (Siem Reap)	Siem Reap	C11	Jul, Aug, 2013 Nov,2013	Close to sparse lowland forests	16 (0,8)	16	0	0
Cambodia (Thala Barivat)	Stung Treng	C32, C33, C34	Dec,2010	Suburban zone close to sparse forest	102 (5,2)	102	0	0
Cabmodia (Mondulkiri)	Kaev Seima	C2, C3	May, 2011 Feb, 2013	Mountains forests with ongoing deforestation	29 (1.5)	29	0	0
Lao PDR (Bolikhamsay)	Pak-kading	C20	May, 2012 Apr, 2013,	Mountains forest Suburban zone close to sparse forest	40 (2)	40	0	0
Lao PDR (Champasak)	Batieng chaleunsouk	C13	Feb, 2013	Close to sparse lowland forests	3 (0,15)	3	0	0
Lao PDR (Houaphan)	Vieng Thong	C25	Mar, Apr, 2011, Dec, 2011, Feb, 2012	Caves and karsts	105 (5,3)	105	0	0
Lao PDR (Khammouane)	Gnommalath	C18	Nov, 12	Mountain forest with karsts	32 (1,6)	32	0	0
Lao PDR (Khammouane)	Hinboon	C19	Mar, 1013	Caves and karsts	3 (0,15)	3	0	0
Lao PDR (Khammouane)	Mahaxai	C17	Feb, 2011	Mountain forest with karsts	9 (0,5)	9	0	0
Lao PDR (Khammouane)	Xebangfay	C15, C16	Feb, 2011	Close to sparse lowland forest, and mountain forest	35 (1,8)	35	0	0
Lao PDR (Luang Namtha)	Luang Namtha	C26	Dec, 2012	Mountain forest with karsts	14 (0,7)	14	0	0
Lao PDR (Luang Namtha)	Mueang Sing	C27	Dec, 2012	Close to sparse lowland forests	22 (1,1)	22	0	0

Lao PDR (Phongsaly)	Bountai	C28	Dec, 2012	Urban area close to areas with ongoing deforestation	2 (0,1)	2	0	0
Lao PDR (Saravan)	Saravan,	C14	Mar, Jun, 2012 Feb, 2013	Close to lowland forest, mountain forest and karsts	74 (3,8)	74	0	0
Lao PDR (Vientiane)	Kasi	C24	Feb, Aug, 2011, Jan, Feb,2012, Jun, Aug, 2012, Jun-2013	Mountain forest with karsts	281 (14,3)	281	0	0
Lao PDR (Vientiane)	Meuang Feuang	C21	Jan, Jun, 2012, Aug, 2012, Dec, 2013	Mountain forest with karsts	110 (5,6)	110	0	0
Lao PDR (Vientiane)	Vang Vieng	C23	Feb, Aug, 2011, Sep, 2011, Jan, 2012	Mountain forest with karsts	176(9)	176	0	0

Table 2

			Cambodia		Lao PDR	
Family and species of bat	No. of tested animals (no. of positive)	Percentage of positive (%) [confidence interval]	No. of tested animals (no. of positive)	Ref. of site (+)	No. of tested animals (no. of positive)	Ref. of site (+)
<i>F/ Emballonuridae</i>	148(0)	0	148(0)		0(0)	
<i>Taphozous longimanus</i>	27(0)	0	27(0)	C9	0(0)	
<i>Taphozous melanopogon</i>	121(0)	0	121(0)	C1, C32, C33	0(0)	
<i>F/ Hipposideridae</i>	62(2)	3,23 [0; 7,6]	4(0)		58(2)	
<i>Aselliscus stoliczkanus</i>	7(0)	0	0(0)		7(0)	C25
<i>Hipposideros armiger</i>	12(0)	0	0(0)		12(0)	C19, C23, C24
<i>Hipposideros galeritus</i>	1(0)	0	1(0)	C31	0(0)	
<i>Hipposideros larvatus</i>	37(2)	5,41 [0; 12,7]	0(0)		37(2)	C14(+) , C23
<i>Hipposideros lylei</i>	1(0)	0	0(0)		1(0)	C24
<i>Hipposideros pomona</i>	3(0)	0	3(0)	C33	0(0)	
<i>Hipposideros scutinares</i>	1(0)	0	0(0)		1(0)	C21
<i>F/ Megadermatidae</i>	21(0)	0	21(0)		0(0)	
<i>Megaderma lyra</i>	20(0)	0	20(0)	C32, C41	0(0)	
<i>Megaderma spasma</i>	1(0)	0	1(0)	C33	0(0)	
<i>F/ Pteropodidae</i>	1124(55)	4,89[3,6; 6,2]	416(25)		708(30)	
<i>Cynopterus brachyotis</i>	35(4)	11,43 [0,8; 21,8]	35(4)	C12(+) , C5(+)	0(0)	
<i>Cynopterus sp.</i>	199(8)	4,02 [1,3; 6,7]	192(8)	C10(+) , C11, C29, C30, C32(+) , C34, C35, C36, C37, C38(+) , C39(+) , C40, C41, C42, C44, C5(+)	7(0)	C21, C24,
<i>Cynopterus sphinx</i>	107(3)	2,8 [0; 5,9]	91(3)	C10, C12(+) , C37(+) , C41, C42, C5(+) , C7	16(0)	C23, C24, C26, C27, C28,
<i>Eonycteris spelaea</i>	89(10)	11,24 [4,7; 17,8]	28(4)	C37(+) , C38(+) , C39(+) , C40	61(6)	C16, C21(+) , C23(+) , C24(+)
<i>Macroglossus sobrinus</i>	8(0)	0	1(0)	C10(+)	7(0)	C21, C24

<i>Macroglossus sp.</i>	20(4)	20 [2,5; 37,5]	20(4)	C10, C7(+)	0(0)
<i>Megaerops niphanae</i>	130(1)	0,77 [0; 2,3]	16(1)	C29, C30, C34, C39, C5, C7	114(0) C13, C14, C15, C16, C20, C21, C23, C24, C26, C27
<i>Megaerops sp</i>	12(0)	0	12(0)	C36, C37	0(0)
<i>Pteropus lylei</i>	10(0)	0	10(0)	C11	0(0)
<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	32(3)	9,38 [0;19,5]	2(0)	C10, C37	30(3) C21(+), C23(+), C24
<i>Rousettus leschenaultii</i>	98(1)	1,02 [0;3]	4(0)	C10, C37	94(1) C21(+), C23, C24,
<i>Rousettus sp.</i>	384(21)	5,47 [3,2; 7,7]	5(1)	C11, C33(+), C34	379(20) C14, C15(+), C16(+), C17, C20, C21, C22, C23(+), C24(+)
F/ Rhinolophidae	154(1)	0,65 [0;1,9]	52(1)		102(0)
<i>Rhinolophus acuminatus</i>	3(0)	0	3(0)	C37	0(0)
<i>Rhinolophus affinis</i>	21(0)	0	10(0)	C41, C42	11(0) C23, C25
<i>Rhinolophus luctus</i>	2(0)	0	1(0)	C43	1(0) C25
<i>Rhinolophus malayanus</i>	1(0)	0	1(0)	C31	0(0)
<i>Rhinolophus pearsonii</i>	2(0)	0	0(0)		2(0) C25
<i>Rhinolophus shameli</i>	47(1)	2,13 [0;6,3]	37(1)	C31, C33(+), C41, C42	10(0) C25
<i>Rhinolophus sp.</i>	62(0)	0	0(0)		62(0) C14, C21, C25
<i>Rhinolophus stheno</i>	16(0)	0	0(0)		16(0) C25
F/ Vespertilionidae	456(35)	7,68 [5,2;10,1]	418(35)		38(0)
<i>Harpiocephalus harpia</i>	1(0)	0	0(0)		1(0) C20
<i>Ia io</i>	32(0)	0	0(0)		32(0) C18
<i>Myotis horsfieldii</i>	50(2)	4 [0;9,4]	50(2)	C4(+)	0(0)
<i>Myotis ricketti</i>	5(0)	0	0(0)		5(0) C20
<i>Pipistrellus coromandra</i>	29(2)	6,9 [0;16,1]	29(2)	C2(+), C3(+)	0(0)
<i>Scotophilus sp.</i>	338(31)	9,25 [6,1;12,4]	338(31)	C1(+), C6(+), C8, C9(+)	0(0)

<i>Tylonycteris robustula</i>	1(0)	0	1(0)	C35	0(0)
Total	1965(93)	4,73 [3,8;5,7]	1059(61)		906(32)

F/ indicates the family of bat

(+) indicates a site where bats tested positive for coronavirus were found

Supplementary Table 1: Primers used for detection of CoVs

Gene	Round	Primer name	Sequence 5'-3'
RdRp	1st	CoV-Fwd1	GGTTGGGAYTAYCCHAARTGTGA
RdRp	1st and 2nd	CoV-Rvs2	CCATCATCASWYRAATCATCATA
RdRp	2nd	CoV-Fwd2	GAYTAYCCHAARTGTGAYAGAGC

Supplementary Table 2. Accession numbers of sequences deposited in GenBank, and corresponding named used for sequence analyses

For alignment analysis, each sample was abbreviated as follow: Strain_SampleName_animalClassification

For instance, the sequence "Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0109", corresponding to the Bat coronavirus 512/2005 strain, detected in the sample KHP13-PTR1-0109(P109), from a *Scotophilus kuhlii* (Sku) was abbreviated as: BatCoV-512_P109_Sku

Accession number	Strain	Name used for sequence analyses
KX284902	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-A0058	BatCoV-HKU9_A58_Rsp
KX284903	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-A0071	BatCoV-HKU9_A71_Rsp
KX284904	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-A0077	BatCoV-HKU9_A77_Rsp
KX284905	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-A0094	BatCoV-HKU9_A94_Rsp
KX284906	PREDICT_CoV-22/LAP11-D0063	PREDICT-CoV-22_D63_Espl
KX284907	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-D0064	BatCoV-HKU9_D64_Rsp
KX284908	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-J0087	BatCoV-HKU9_J87_Espl
KX284909	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-J0091	BatCoV-HKU9_J91_Rlc
KX284910	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-J0095	BatCoV-HKU9_J95_Rap
KX284911	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-K0006	BatCoV-HKU9_K06_Espl
KX284912	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-K0012	BatCoV-HKU9_K12_Espl
KX284913	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-K0038	BatCoV-HKU9_K38_Rap
KX284914	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-K0040	BatCoV-HKU9_K40_Rap
KX284915	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-M0052	BatCoV-HKU9_M52_Rsp
KX284916	PREDICT_CoV-23/LAP11-M0053	PREDICT-CoV-23_M53_Rsp
KX284917	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP11-M0054	BatCoV-HKU9_M54_Rsp
KX284918	PREDICT_CoV-23/LAP12-A0005	PREDICT-CoV-23_A05_Rsp
KX284919	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP12-A0008	BatCoV-HKU9_A08_Espl
KX284920	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP12-A0010	BatCoV-HKU9_A10_Rsp
KX284921	PREDICT_CoV-23/LAP12-A0011	PREDICT-CoV-23_A11_Rsp
KX284922	PREDICT_CoV-23/LAP12-A0012	PREDICT-CoV-23_A12_Rsp
KX284923	PREDICT_CoV-23/LAP12-A0019	PREDICT-CoV-23_A19_Rsp
KX284924	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP12-A0021	BatCoV-HKU9_A21_Rsp
KX284925	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP12-A0022	BatCoV-HKU9_A22_Rsp

KX284926	PREDICT_CoV-23/LAP12-A0024	PREDICT-CoV-23_A24_Rsp
KX284931	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP12-D0077	BatCoV-HKU9_D77_Rsp
KX284932	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP12-E0004	BatCoV-HKU9_E04_Espl
KX284933	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP12-E0016	BatCoV-HKU9_E16_Rsp
KX284934	PREDICT_CoV-23/LAP12-E0019	PREDICT-CoV-23_E19_Rsp
KX284935	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-LAP12-E0072	BatCoV-HKU9_E72_Rsp
KX284936	PREDICT_CoV-53/LAP12-E1-0041	PREDICT-CoV-53_E141_Hla
KX284937	PREDICT_CoV-53/LAP12-E1-0052	PREDICT-CoV-53_E152_Hla
KX285722	Porcine epidemic diarrhea virus/PREDICT-KH11KCh1-0004	PEDV_Kch1-04_Myhs
KX285724	Porcine epidemic diarrhea virus/PREDICT-KH11KCh1-0013	PEDV_Kch1-13_Myhs
KX285726	PREDICT_CoV-24/KHP11SR2-0043	PREDICT-CoV-24_SR2-43_Cspx
KX285728	PREDICT_CoV-24/KHP11SR2-0045	PREDICT-CoV-24_SR2-45_Cybr
KX285730	PREDICT_CoV-24/KHP11SR3-0016	PREDICT-CoV-24_SR3-16_Cysp
KX285732	PREDICT_CoV-24/KHP11TB-0119	PREDICT-CoV-24_B119_Cybr
KX285734	PREDICT_CoV-24/KHP11TB-0120	PREDICT-CoV-24_B120_Cybr
KX285736	PREDICT_CoV-24/KHP11TB-0121	PREDICT-CoV-24_B121_Cybr
KX285738	PREDICT_CoV-24/KHP11TB-0123	PREDICT-CoV-24_B123_Cspx
KX285739	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0024B	BatCoV-512_P024_Sku
KX285740	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0026B	BatCoV-512_P026_Sku
KX285741	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0037B	BatCoV-512_P037_Sku
KX285742	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0039B	BatCoV-512_P039_Sku
KX285743	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0046B	BatCoV-512_P046_Sku
KX285744	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0050B	BatCoV-512_P050_Sku
KX285745	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0079B	BatCoV-512_P079_Sku
KX285746	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0090B	BatCoV-512_P090_Sku
KX285747	PREDICT_CoV-35/KHP12PTR1-0095B	PREDICT-CoV-35_P095_Sku
KX285748	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0121B	BatCoV-512_P121_Sku
KX285749	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0129B	BatCoV-512_P129_Sku
KX285750	PREDICT_CoV-35/KHP12PTR1-0150B	PREDICT-CoV-35_P150_Sku
KX285751	PREDICT_CoV-35/KHP12PTR1-0160B	PREDICT-CoV-35_P160_Sku
KX285752	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP12PTR1-0165B	BatCoV-512_P165_Sku
KX285753	Bat coronavirus/512/KHP12PTR1-0159B	BatCoV-512_P159_Sku
KX285754	Bat coronavirus/512/KHP12PTR1-0163B	BatCoV-512_P163_Sku
KX285755	PREDICT_CoV-24/KHP12SJP1-0007	PREDICT-CoV-24_JP1-07_Mgni
KX285758	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-KHP13-BN1-0003	BatCoV-HKU9_BN1-3_Msp
KX285759	PREDICT_CoV-22/KHP13-BN1-0014	PREDICT-CoV-22_BN1-14_Msp
KX285760	PREDICT_CoV-22/KHP13-BN1-0015	PREDICT-CoV-22_BN1-15_Msp

KX285761	Bat coronavirus HKU9/PREDICT-KHP13-BN1-0021	BatCoV-HKU9_BN1-21_Msp
KX285762	PREDICT_CoV-24/KHP13-BN1-0023	PREDICT-CoV-24_BN1-23_Cysp
KX285763	PREDICT_CoV-34/KHP13-GT1-0003	PREDICT-CoV-34_GT1-3_Pisp
KX285764	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-OTP1-0063	BatCoV-512_OTP1-63_Sku
KX285765	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0006	BatCoV-512_P006_Sku
KX285766	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0022	BatCoV-512_P022_Sku
KX285767	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0030	BatCoV-512_P030_Sku
KX285768	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0035	BatCoV-512_P035_Sku
KX285769	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0037	BatCoV-512_P237_Sku
KX285770	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0039	BatCoV-512_P239_Sku
KX285771	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0040	BatCoV-512_P040_Sku
KX285772	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0042	BatCoV-512_P042_Sku
KX285773	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0067	BatCoV-512_P067_Sku
KX285776	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0108	BatCoV-512_P108_Sku
KX285777	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0109	BatCoV-512_P109_Sku
KX285778	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-SL2-0009	BatCoV512_SL2-9_Pispa
KX285780	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHPPT-0008	BatCoV-512_PT08_Sku
KX285782	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHPPT-0023	BatCoV-512_PT23_Sku
KX285783	PREDICT_CoV-24/PV1206_PA162	PREDICT-CoV-24_PA162_Cysp
KX285784	PREDICT_CoV-24/PV1206_PA178	PREDICT-CoV-24_PA178_Rsp
KX285785	PREDICT_CoV-25/PV1206_PA201	BatCoV-25_PA201_Rhsh
KX285786	Bat coronavirus 512/2005/PREDICT-KHP13-PTR1-0001	BatCoV-512_P201_Sku
KX520653	Bat coronavirus/ β CoV/RK058/ <i>Eonycteris spelaea</i>	BatCoV_RK58_Espl
KX520654	Bat coronavirus/ β CoV/RK059/ <i>Cynopterus sphinx</i>	BatCoV_RK59_Cspx
KX520655	Bat coronavirus/ β CoV/RK065/ <i>Cynopterus</i> sp	BatCoV_RK65_Cysp
KX520656	Bat coronavirus/ β CoV/RK071/ <i>Cynopterus</i> sp	BatCoV_RK71_Cysp
KX520657	Bat coronavirus/ β CoV/RK072/ <i>Cynopterus</i> sp	BatCoV_RK72_Cysp
KX520658	Bat coronavirus/ β CoV/RK74/ <i>Eonycteris spelaea</i>	BatCoV_RK74_Espl
KX520659	Bat coronavirus/ β CoV/RK075/ <i>Cynopterus</i> sp	BatCoV_RK75_Cysp
KX520660	Bat coronavirus/ β CoV/RK077/ <i>Eonycteris spelaea</i>	BatCoV_RK77_Espl
KX520661	Bat coronavirus/ β CoV/RK091/ <i>Eonycteris spelaea</i>	BatCoV_RK91_Espl
KX520662	Bat coronavirus/ β CoV/RK096/ <i>Cynopterus sphinx</i>	BatCoV_RK96_Cspx

Supplementary Table 3: Mammals and provinces abbreviations used for coding coronavirus samples.

Mammal's classification	Abbreviation
<i>Artibeus jamaicensis</i> (bat)	Arja
<i>Carollia perspicillata</i> (bat)	Cape
<i>Cynopterus sphinx</i> (bat)	Cspx
<i>Cynopterus brachyotis</i> (bat)	Cybr
<i>Cynopterus</i> sp. (bat)	Cysp
<i>Dobsonia moluccensis</i> (bat)	Domo
<i>Eidolon dupreanum</i> (bat)	Eidu
<i>Eonycteris spelaea</i> (bat)	Espl
<i>Hipposideros</i> sp. (bat)	Hpo
<i>Hipposideros larvatus</i> (bat)	Hla
<i>Hipposideros lekaguli</i> (bat)	Hle
<i>Hipposideros diadema</i> (bat)	Hdi
<i>Ia</i> sp. (bat)	Isp
<i>Macroglossus sobrinus</i> (bat)	Msb
<i>Megaderma lyra</i> (bat)	Mly
<i>Megaerops kusnoto</i> (bat)	Mgku
<i>Megaerops niphanae</i> (bat)	Mgni
<i>Miniopterus magnater</i> (bat)	Migm
<i>Myotis horsfieldii</i> (bat)	Myhs

<i>Myotis ricketti</i> (bat)	Myri
<i>Neoromicia capensis</i> (bat)	Neca
<i>Pipistrellus abramus</i> (bat)	Piab
<i>Pipistrellus</i> sp. (bat)	Pisp
<i>Rhinolophus</i> sp. (bat)	Rhsp
<i>Rhinolophus shameli</i> (bat)	Rhsh
<i>Rhinolophus hipposideros</i> (bat)	Rhhi
<i>Rousettus</i> sp. (bat)	Rsp
<i>Rousettus leschenaulti</i> (bat)	Rlc
<i>Rousettus amplexicaulis</i> (bat)	Rap
<i>Rousettus aegyptiacus</i> (bat)	Reag
<i>Scotophilus</i> sp. (bat)	Ssp
<i>scotophilus heathii</i> (bat)	She
<i>Scotophilus kuhlii</i> (bat)	Sku
<i>Taphozous</i> sp. (bat)	Tsp
<i>Taphozous melanopogon</i> (bat)	Tmg
<i>Homo sapiens</i> (human)	Hsa
<i>Sus</i> sp. (pig)	Susp

9. Figure legends

Figure 1. Geographic distribution of samples collected in Lao PDR and Cambodia.

Sampling sites are shown by triangles and labeled from C1 to C44 (Table 1). The 21 sites where bats tested positive for coronaviruses are identified with a red triangle.

Figure 2. Phylogenetic analysis of coronavirus sequences based on a 115 amino acid fragment of the RdRp gene. The tree was constructed by neighbor joining and bootstrap values were determined by 1,000 replicates. The tree is rooted to an avian coronavirus (FJ376622).

Supplementary Figure 1. Phylogenetic relationships between chiroptera species in this study based on alignment of 330 amino acid sequences of cytochrome b genes. The tree was constructed by neighbor joining and bootstrap values were determined by 1,000 replicates. The tree is rooted to *Lonchura_malacca* (KJ456324).

Supplementary Figure 2. Phylogenetic analysis of CoV based on a 320 nucleotides fragment on the RdRp gene. Tree is rooted to an avian coronavirus (FJ376622). Subgroups where coronaviruses

Figure 1

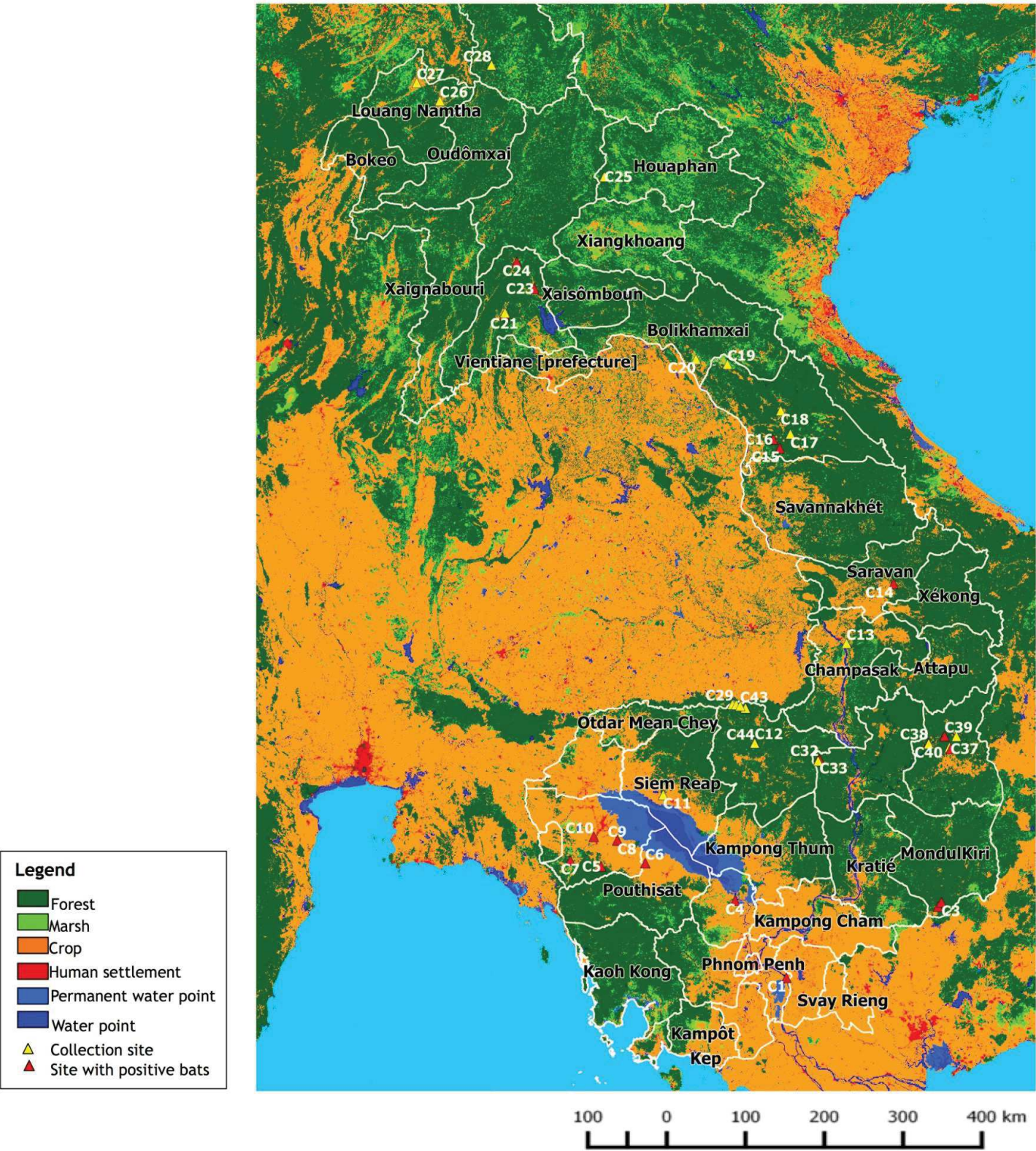


Figure 2 (A)

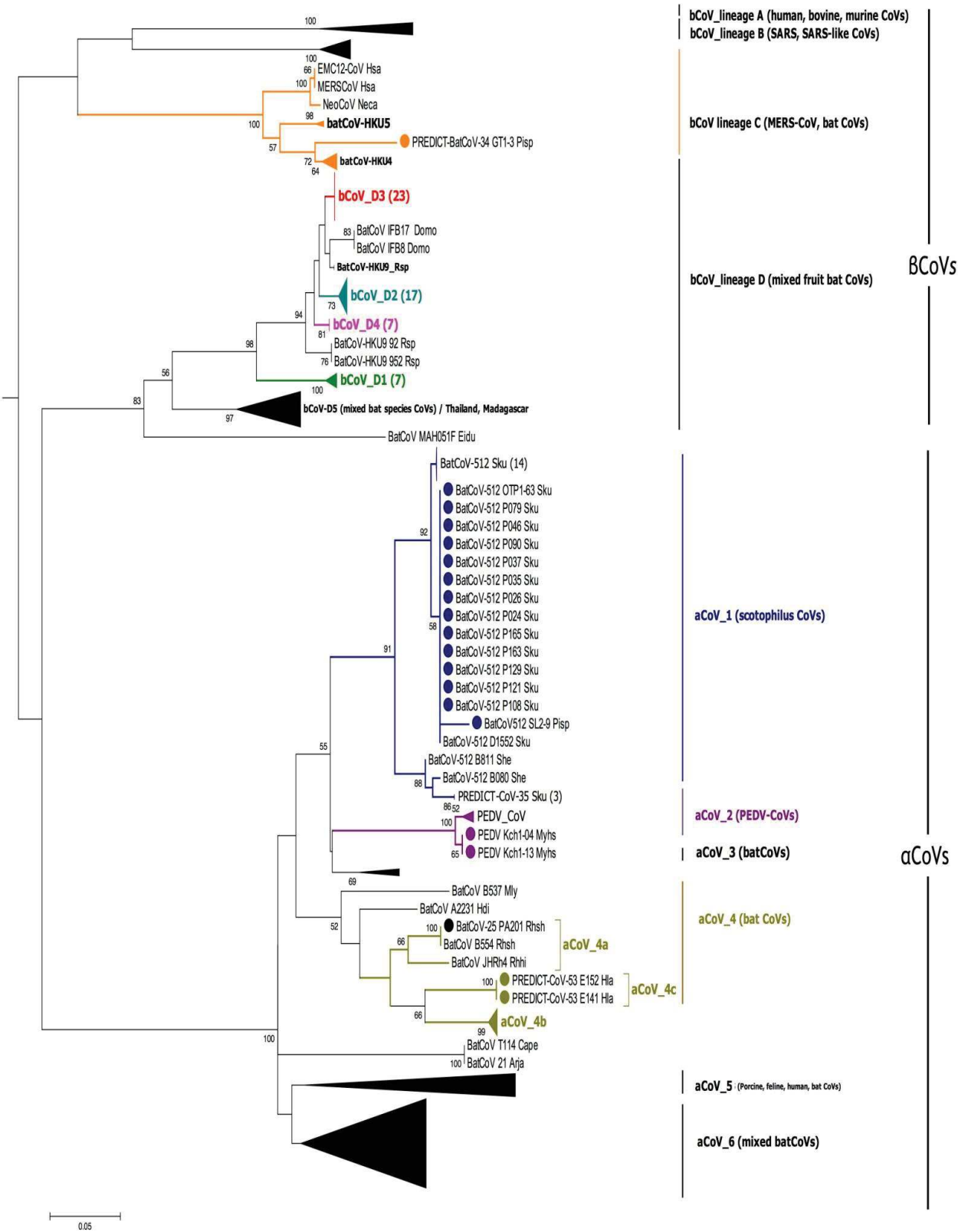


Figure 2 (B)

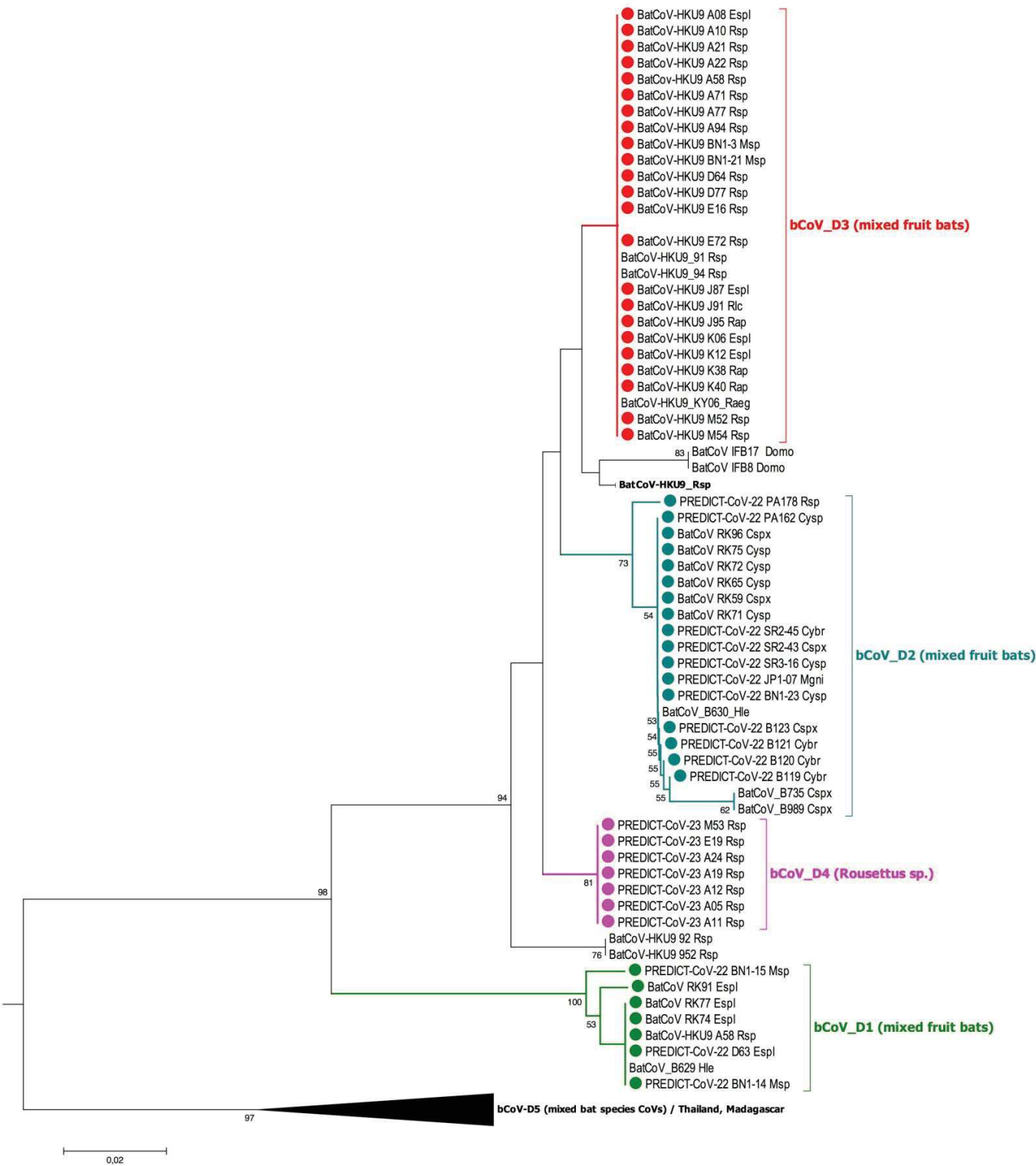
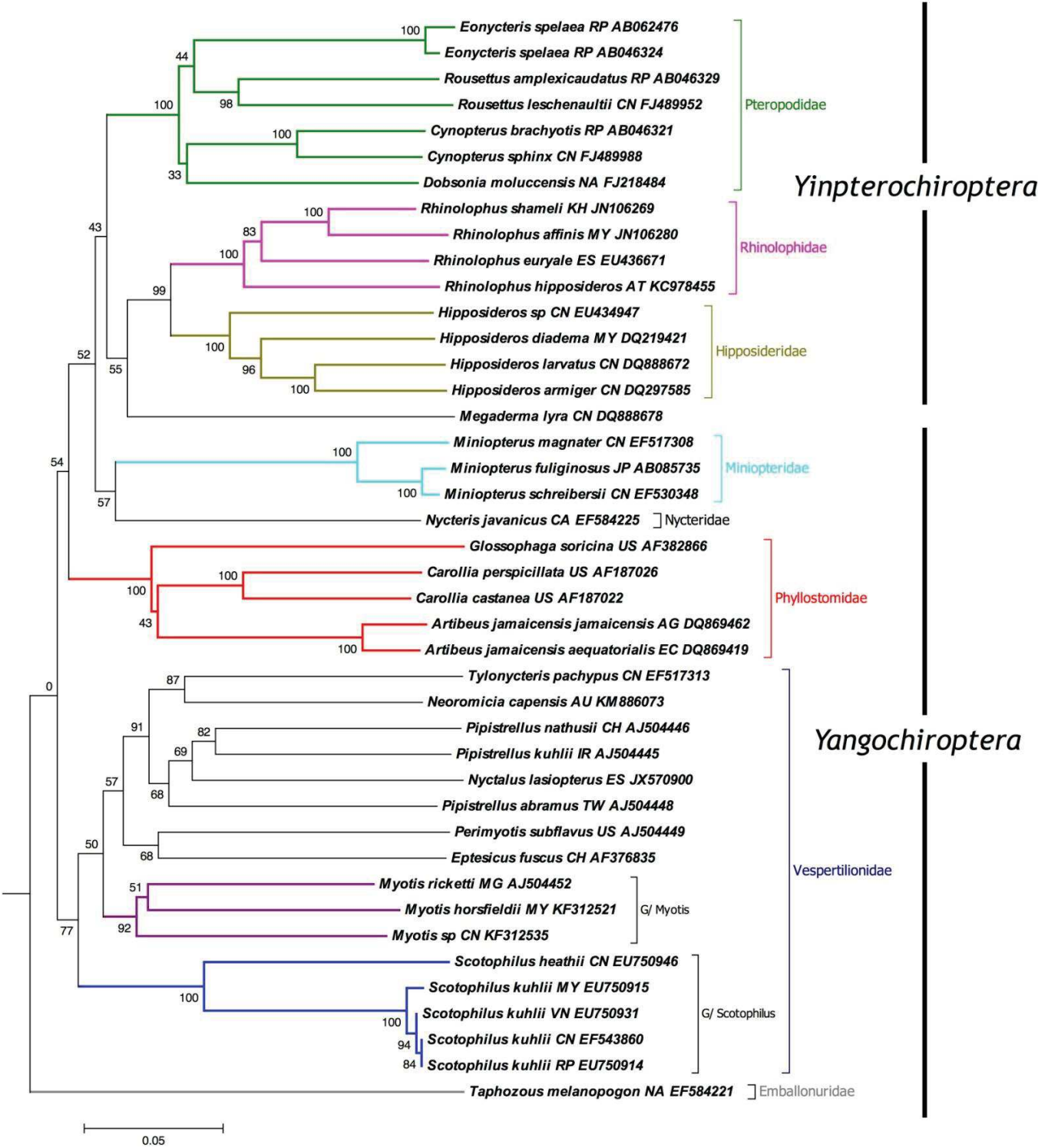
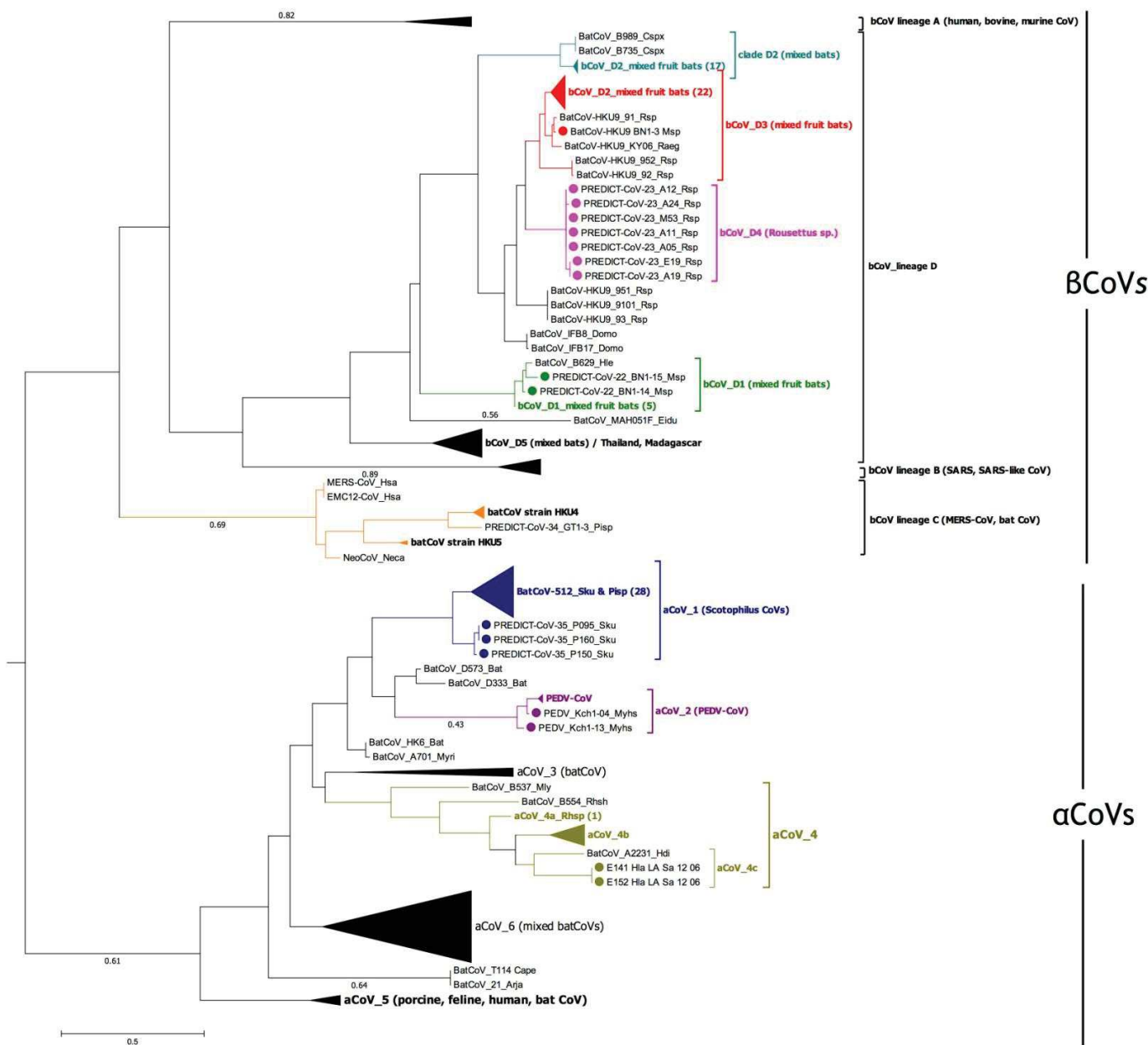


Figure 3



Supplementary Figure 1



Implications et perspectives

Implications

Cette étude a permis de mettre en évidence une grande diversité de coronavirus circulant chez diverses espèces de chiroptères frugivores et insectivores au Laos et Cambodge. Cela a permis également de détecter de nouveaux réservoirs de CoVs, en particulier chez des chiroptères frugivores d'Asie, ce qui était jusqu'alors peu documenté (Anindita *et al.*, 2015; Wacharapluesadee *et al.*, 2015).

La bonne corrélation entre la phylogénie des chiroptères et celle des coronavirus détectés et la vaste répartition géographique des hôtes, évoque la possibilité d'une potentielle co-évolution entre virus et hôtes. Néanmoins, la présence de CoVs apparentés au même cluster chez divers genres d'hôtes, souligne que des phénomènes de transmission horizontale existent chez ce virus, à travers de potentiels contacts entre espèces lors de l'exploitation de mêmes environnements. Ceci signifie que l'étendue géographique réelle de ces virus semble comparable à celle des chiroptères et qu'il est nécessaire de continuer les investigations dans des zones géographiques où les chiroptères sont présents et chez un panel d'espèces chiroptères plus large.

En détectant des CoVs chez des animaux destinés à la consommation directe ou l'exploitation de produits dérivés, nous avons montré que les populations humaines qui sont au contact de ces animaux, sont exposées à ces virus. Au travers de ces pratiques communes, les Hommes sont en contact direct avec ces animaux et les virus qu'ils transportent. La détection de CoVs dans les écouvillons rectaux souligne que les Hommes sont également

exposés de manière indirecte à ces virus à travers les excréta qui peuvent souiller des aliments ou infecter d'autres hôtes intermédiaires au contact des Hommes.

Les CoVs détectés lors de cette étude semblent majoritairement liés génétiquement à des souches détectées chez des chiroptères uniquement. Cela laisse penser que les virus auraient une capacité de transmission à l'Homme limitée. Cependant, deux souches de CoVs détectées, apparentées au PEDV et au MERS-CoV semblent présenter un risque plus important de transmission à d'autres mammifères, et d'autant plus qu'elles ont été détectées chez des chiroptères synanthropiques. Dans ce contexte, ce travail soulève plusieurs perspectives de recherche:

(i) Ces observations soulignent la nécessité d'explorer la circulation de ces virus aux interfaces entre chiroptères et autres mammifères. Cela pourrait être effectué dans un premier temps, par le biais d'études sérologiques auprès des habitants, au niveau des élevages (notamment porcins) aux alentours des sites où ont été détectés les deux souches reliées aux groupes du MERS-CoV et aux PEDV-CoVs des sites où les espèces chiroptères hôtes sont présentes. Dans le cas où des souches de CoVs similaires circuleraient, il serait intéressant d'effectuer des études moléculaires sur ces souches afin de d'évaluer leurs positions phylogénétiques avec les souches déjà caractérisées.

(ii) A l'échelle du virus lui-même, l'étude de la capacité à passer la barrière d'hôte est une perspective de recherche importante.

La capacité d'infection par ces virus d'autres organismes mammifères peut être évaluée par le biais de travaux d'infection de cultures cellulaires. L'étude des protéines du virus impliquées dans l'infection des cellules hôtes peut également apporter des éléments de réponse ou de

discussion sur ce point. Ceci peut s'effectuer par exemple par le suivi de l'expression de certains gènes impliqués dans l'entrée et l'infection des cellules hôtes, ou par la caractérisation moléculaire de la région codant la protéine impliquée dans l'entrée des virus dans les cellules : le gène codant la protéine de spicule. Cet axe de recherche est abordé dans le quatrième chapitre de cette thèse.

(iii) Les virus étant clairement liés à leur hôtes, il serait judicieux d'étudier l'évolution des populations de chiroptères à travers celle des paysages et de l'environnement dans lequel évoluent ces hôtes. En effet, les paysages ont beaucoup évolués ces dernières décennies en Asie du Sud-Est, en raison notamment de l'exploitation des ressources forestières, du développement de l'agriculture ainsi que de la croissance démographique. Le Cambodge et le Laos n'échappent pas à cette tendance. Avec une très forte diversité de chiroptères, l'impact de tous ces changements environnementaux sur ces populations nécessitent d'être investigué. Cet axe de recherche sera exploré dans le dernier chapitre de cette thèse (Chapitre 5).

(iv) L'exploitation du même environnement par l'Homme via l'urbanisation et les modifications du paysage a un impact sur la distribution de chiroptères dans ces deux pays. Ces phénomènes peuvent favoriser comme limiter les contacts avec certaines espèces chiroptères, et nécessitent d'être investigués. De même, il est nécessaire d'étudier les pratiques de chasse, de consommation et du commerce des chiroptères, ainsi que de la collecte de guano, où les travailleurs n'ont aucune protection. A long terme, la compréhension approfondie de ces pratiques permettrait d'identifier les personnes les plus à risque et d'orienter des mesures de sensibilisation de la population face aux éventuels problèmes liés à la manipulation de ces animaux. Au Cambodge, cette sensibilisation pourrait s'effectuer par le biais des travailleurs de santé communautaires (Sin *et al.*, 2005).

Limites et perspectives de l'étude

Lors de cette étude, la collecte des échantillons de chiroptères était opportuniste et les prélèvements hétérogènes et irréguliers à travers le temps. Par exemple, 80% des échantillons proviennent de deux familles de chiroptères seulement. Ceci ne permet pas d'établir une analyse épidémiologique très poussée sur la circulation des virus chez les chiroptères. Ces premiers résultats montrent néanmoins la nécessité d'effectuer une étude sur le long terme avec un échantillonnage représentatif de la diversité réelle des chiroptères présents au niveau des interfaces avec l'Homme. Un échantillonnage régulier au cours du temps permettrait également d'inclure la saisonnalité dans l'analyse. Pour prendre en compte tous ces paramètres, il serait intéressant de mettre en place une surveillance active sur ces hôtes, aussi bien au niveau des microchiroptères vivant tout près ou dans les habitations, qu'au niveau des chiroptères frugivores régulièrement chassés et consommés.

L'identification des espèces de chiroptères collectés s'est faite sur le terrain, selon des critères morphologiques. Parfois, l'état de l'animal collecté ou le manque de connaissances des équipes de collecte n'a pas pu permettre d'aboutir à une détermination précise de l'espèce. L'obtention de séquences du gène du cytochrome b des chiroptères à partir des échantillons correspondants aurait permis, dans un premier temps, de valider et préciser l'identification des espèces. Dans un deuxième temps, l'étude des séquences partielles de ce gène pourrait permettre d'approfondir les relations phylogénétiques entre les hôtes chiroptères collectés ainsi que leur diversité génétique. Cette technique, dite du "bar coding" est souvent utilisée dans des études similaires sur d'autres continents. De manière plus générale, l'étude de ces gènes peut permettre de comparer plus précisément la phylogénie de virus ou pathogènes détectés avec celles de leurs hôtes.

Conclusion de l'étude

Notre étude a permis de détecter la présence et circulation de coronavirus chez les chiroptères au Laos et au Cambodge. La présence de CoVs chez des chiroptères anthropophiles et de séquences appartenant génétiquement à des groupes de CoVs où le passage de la barrière d'espèce a déjà été prouvé, souligne la nécessité de continuer les investigations sur la circulation de ces souches, en incluant également les animaux domestiques et les populations humains. Cette étude souligne également la nécessité d'étudier le potentiel de transmission à l'Homme de ces souches.

Chapitre 3 : La détection des astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos

Contexte et objectif de l'étude

Les astrovirus (astVs) sont responsables d'épisodes de gastro-entérites modérées à aiguës chez un large panel d'hôtes mammifères et aviaires, et circulent sur une vaste étendue géographique (Meliopoulos et Schultz-Cherry, 2012). Une très grande diversité d'astVs existe chez les mammifères, incluant les ruminants domestiques, carnivores, rongeurs, primates, mammifères marins et mammifères volants : les chiroptères. Récemment, la détection de souches humaines chez des primates, souligne le pouvoir de passage de la barrière d'espèce des astrovirus et la nécessité de connaître les réservoirs et souches potentielles qui circulent (Karlsson *et al.*, 2015).

Les chiroptères sont considérés comme d'excellents réservoirs de virus, et notamment de virus à ARN qui peuvent être pathogènes pour l'Homme, comme les coronavirus. Les seules études effectuées chez les chiroptères en Asie et ont mis en évidence une très grande diversité d'astrovirus chez plusieurs espèces chiroptères en Chine (Chu *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009). Ceci suggère qu'il serait intéressant de connaître leur distribution et de savoir si d'autres souches existent au sein des populations chiroptères dans les pays voisins, et en particulier dans l'aire de notre étude.

C'est la raison pour laquelle ce deuxième travail se donne pour but d'évaluer la présence d'astVs chez les chiroptères du Cambodge et Laos, et de caractériser les souches qui y circulent.

L'évaluation du risque du passage de la barrière d'espèce chez les astVs nécessite de déterminer les modalités d'entrée cellulaire du virus. Les premières études suggèrent que l'entrée des astVs dans une cellule cible dépend de la présence de récepteurs cellulaires et de la configuration de la capside virale. L'obtention de séquences codant la capside au niveau de l'ORF2 nous permettrait d'explorer cet axe de recherche.

Cette étude a été effectuée à partir d'échantillons prélevés par l'IPC en 2010 et d'échantillons collectés au cours du projet PREDICT (2011-2013). Dans cette étude, les écouvillons oraux et rectaux ainsi que des fèces collectés ont été testés par diagnostic moléculaire (PCR), ciblant une portion du gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp), à l'aide d'amorces dégénérées (Chu *et al.*, 2008). L'analyse des séquences obtenues a permis de mettre en lumière la distribution de ce virus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos. Le travail de caractérisation des souches a également permis de soulever le polymorphisme génétique élevé des astrovirus et les conséquences sur les caractéristiques du virus.

Principaux résultats

La circulation d'astrovirus chez les chiroptères au Laos et au Cambodge

La présence d'astV a été investiguée chez 1876 chiroptères, et pour la première fois chez des ptéropodidés du genre *Macroglossus*, *Cynopterus*, *Eonycteris* et *Pteropus*. Des séquences d'astrovirus ont été détectées chez 5,3% (n = 100) des chiroptères, appartenant à 9 genres et 6 familles. Un hôte additionnel d'astV a été détecté (genre *Eonycteris*). Ces virus ont été détectés chez des chiroptères frugivores et insectivores destinés à la consommation humaine, ainsi que chez des genres synanthropiques, dont les *Scotophilus*, élevés au Cambodge pour l'exploitation du guano.

L'analyse des séquences montre que les séquences détectées se répartissent dans 10 groupes, dont les branches sont caractérisées par de faibles valeurs de bootstrap dans l'arbre phylogénétique. La plupart des séquences détectées (78 astVs) sont apparentées à des astVs de chiroptères exclusivement. Cependant, 22 séquences qui appartiennent aux groupes 7 et 8, semblent plus proches d'astVs isolés chez d'autres espèces mammifères : le groupe 7 inclut

des astVs isolés chez d'autres mammifères (porcs, bovins, dromadaires, porcs-épics) et le groupe 8 est constitué d'astVs murins uniquement.

L'obtention de séquences plus longues au niveau du gène de la RdRp et de l'ORF2 d'un astV du groupe 7, détecté chez une roussette, a permis de mettre en évidence une nouvelle espèce, selon les critères de l'ICTV. Ceci laisse supposer que le passage de la barrière d'espèce existe dans ce groupe.

Les astVs détectés ne présentent pas de spécificité d'hôte stricte. En effet, on a pu voir qu'une même souche peut être détectée chez des chiroptères d'espèces et d'origines géographiques différentes, collectées à des moments différents (par exemple, astVs du groupe 7 détectée au Cambodge et au Laos respectivement en 2010 et 2012). A l'opposé, des chiroptères provenant d'une même colonie et collectés le même jour, présentent des clusters d'astrovirus différentes (par exemple, les astVs détectés chez les *Scotophilus* provenant d'une exploitation de guano, dans la province de Pursat, au Cambodge).

Enfin, la plupart des échantillons positifs, ayant été détectés à partir de fèces et d'écouvillons rectaux, soulignent une potentielle voie de transmission entre Hommes et chiroptères à travers des excréta et fèces.

De manière générale, cette étude confirme la circulation d'astVs chez les chiroptères au Cambodge et au Laos et le rôle des chiroptères en tant que réservoirs de virus. Le fait que ces virus aient été détectés chez des chiroptères présents à l'interface avec l'Homme, soulève le potentiel risque de transmission à travers les activités de chasse, de consommation des chiroptères et de récolte de guano.

L'analyse du polymorphisme chez les astrovirus

Les analyses sur les séquences et les clones obtenus montrent un polymorphisme très fort et une saturation des séquences. Le nombre de mutations est plus de deux fois supérieur au nombre de sites polymorphiques des séquences. Le taux de mutations synonymes (changement d'acide nucléique qui n'a pas de conséquences sur la séquence protéique) est supérieur à 77%, sur les séquences étudiées. De même, le ratio transition/transversion est inférieur à 1. Ceci indique un niveau de saturation du génôme très élevé. La transition (mutation d'une purine en purine ou d'une pyrimidine vers une pyrimidine) est un événement plus fréquent que la transversion (mutation d'une purine vers une pyrimidine et vice versa). Dans notre cas, les très faibles ratios transition/transversion détectés indiquent que toutes les mutations possibles ou presque, pour un site donné, sont présentes et qu'une descendance peut donc présenter des mutations apparemment réverses, caractéristiques d'un ancêtre. La relation linéaire entre temps et nombre de mutations n'est plus respectée et l'analyse phylogénétique ne permet plus de tirer des conclusions claires. Les résultats de l'analyse phylogénétique des séquences requièrent donc une grande précaution dans leur interprétation. L'accumulation de mutations n'est pas le reflet de l'accumulation de mutations qui ont un sens évolutif réel avec le temps. Il est difficile de parler de diversité des séquences détectées à la vue du polymorphisme observé sur ces séquences et d'identifier des souches différentes.

ARTICLE

Manuscrit de l'article soumis le 21 septembre 2016 au journal *Infections, Genetics and Evolution*.

Manuscript Number:

Title: Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia

Article Type: Research paper

Keywords: Astroviruses, Bats, Genetic diversity, Cambodia, Lao PDR

Corresponding Author: Dr Roger Frutos,

Corresponding Author's Institution: Cirad

First Author: Audrey Lacroix

Order of Authors: Audrey Lacroix; Veasna Duong; Vibol Hul; San Sorn;
Davun Holl; Keo Omaliss; Sokha Chea; Watthana Theppangna; Soubanh
Silithammavong; Alexandre Hassanin; Aneta Afelt; Amanda Fine; Tracey
Goldstein; Damien Joly; Zoe Greatorex; Lucy Keatts; Roger Frutos;
Philippe Buchy

Abstract: Astroviruses are known to infect humans and a wide range of animal species, and can cause gastroenteritis in their hosts. Recent studies have reported astroviruses in bats in Europe and in several locations in China. We sampled 1876 bats from 17 genera at 44 sites from 14 and 13 provinces in Cambodia and Lao PDR respectively, and tested them for astroviruses. Our study revealed a high diversity of astroviruses among various Yangochiroptera and Yinpterochiroptera bats. Evidence for varying degrees of host restriction for astroviruses in bats was found. Furthermore, additional Pteropodid hosts were detected. The astroviruses formed distinct phylogenetic clusters within the genus Mamastrovirus, most closely related to other known bat astroviruses. The astrovirus sequences were found to be highly saturated indicating that phylogenetic relationships should be interpreted carefully. An astrovirus clustering in a group with other viruses from diverse hosts, including from ungulates and porcupines, was found in a Rousettus bat. These findings suggest that diverse astroviruses can be found in many species of mammals, including bats.

Suggested Reviewers: Malik Peiris
Professor, Hong Kong University
malik@hkucc.hku.hk
Specialist of tropical virology and bats viruses

Jordi Serra Cobo
Professor, University of Barcelona
serracobo@areambiental.com
Specialist of bats and bat-borne viruses

Jan Felix Drexler
Professor, University of Bonn Medical Centre
drexler@virology-bonn.de
Specialist of virology

Lin-Fa Wang
Professor, Duke-National University of Singapore
linfa.wang@duke-nus.edu.sg
Specialist of tropical virology and South East Asian viral diseases

Dear Editor-in-Chief,

We are very pleased to submit to *Infection, Genetics and Evolution* a manuscript entitled: **“Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia”** for publication in *Infection, Genetics and Evolution*. The first author is a PhD student who is going to defend this year and time is very important. We would therefore be very grateful if you could consider this manuscript on a fast track process.

Bats are known to be the natural reservoir for several emerging zoonotic viruses. South-East Asia is a hot spot for emerging zoonotic diseases, and displays increasing numbers of interfaces between wildlife and humans, hence, the importance to identify viruses present in bat populations in this region. Astroviruses (AstVs) have been reported in bat species from several Asian countries, but no study has been performed so far in bats from Cambodia or Lao PDR, where bat hunting and consumption, as well as guano farming are common, providing opportunities for human contamination. In this work, we assessed the circulation and the genetic diversity of Astroviruses in bats in these two countries.

Almost 2000 bats were collected at human interfaces between 2010 and 2013, and tested for the presence of Astroviruses by molecular assay. We found 5.5% of positive bats from a large diversity (17 genera) of insectivorous and frugivorous bats, including a novel host for astroviruses, i.e. nectar bats from the genus *Eonycteris*. We also found a new species of astrovirus in fruit bats (*Rousettus* sp.). The detected astroviruses displayed a very high polymorphism with a high level of genome saturation and potential for hypermutation.

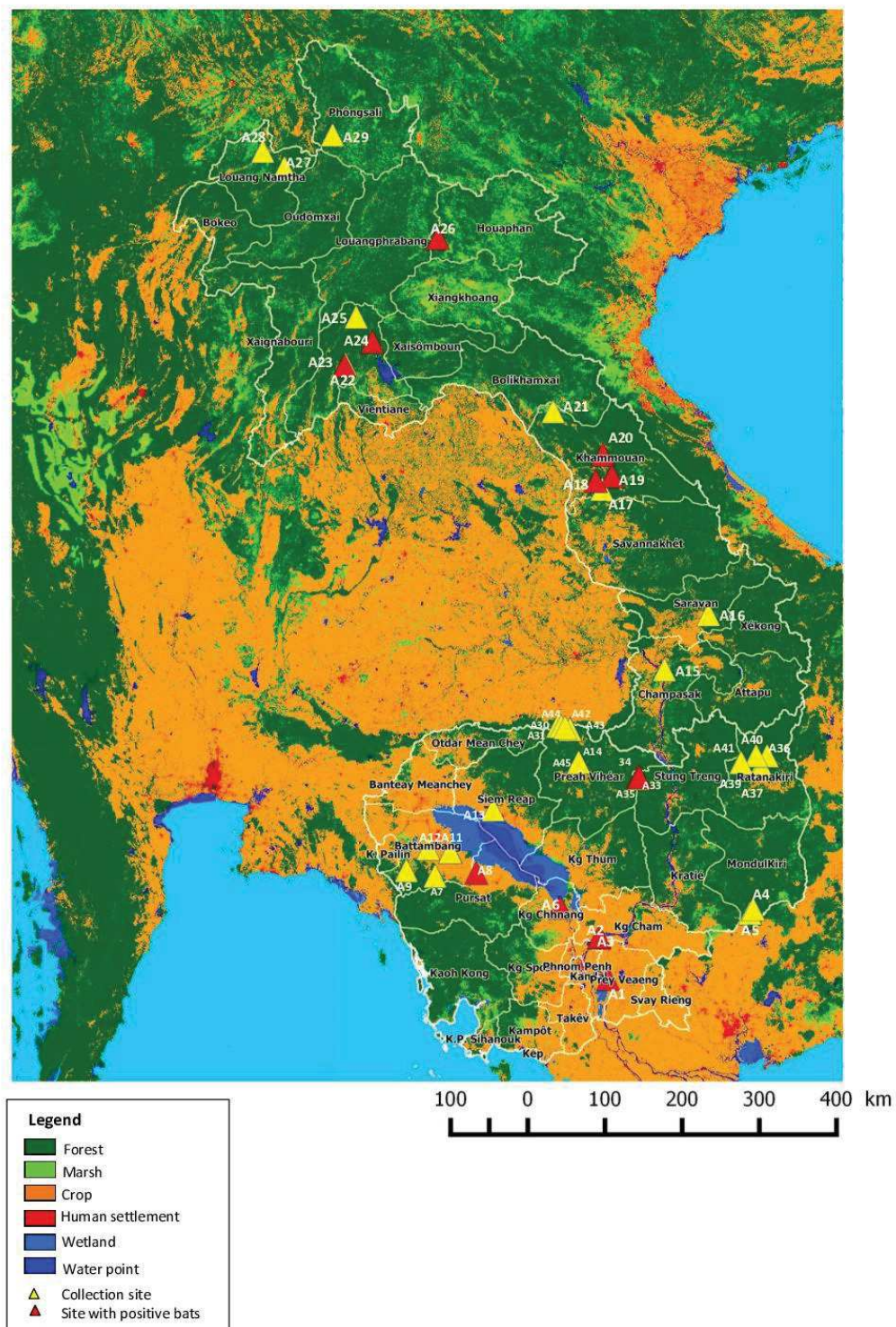
This is the first report of astroviruses detection in bat populations in Cambodia and Lao PDR. We brought the evidence that bats at the interface with human populations and meant to be consumed present a high diversity of AstVS. Further investigations should then be performed to assess the potential zoonotic risk.

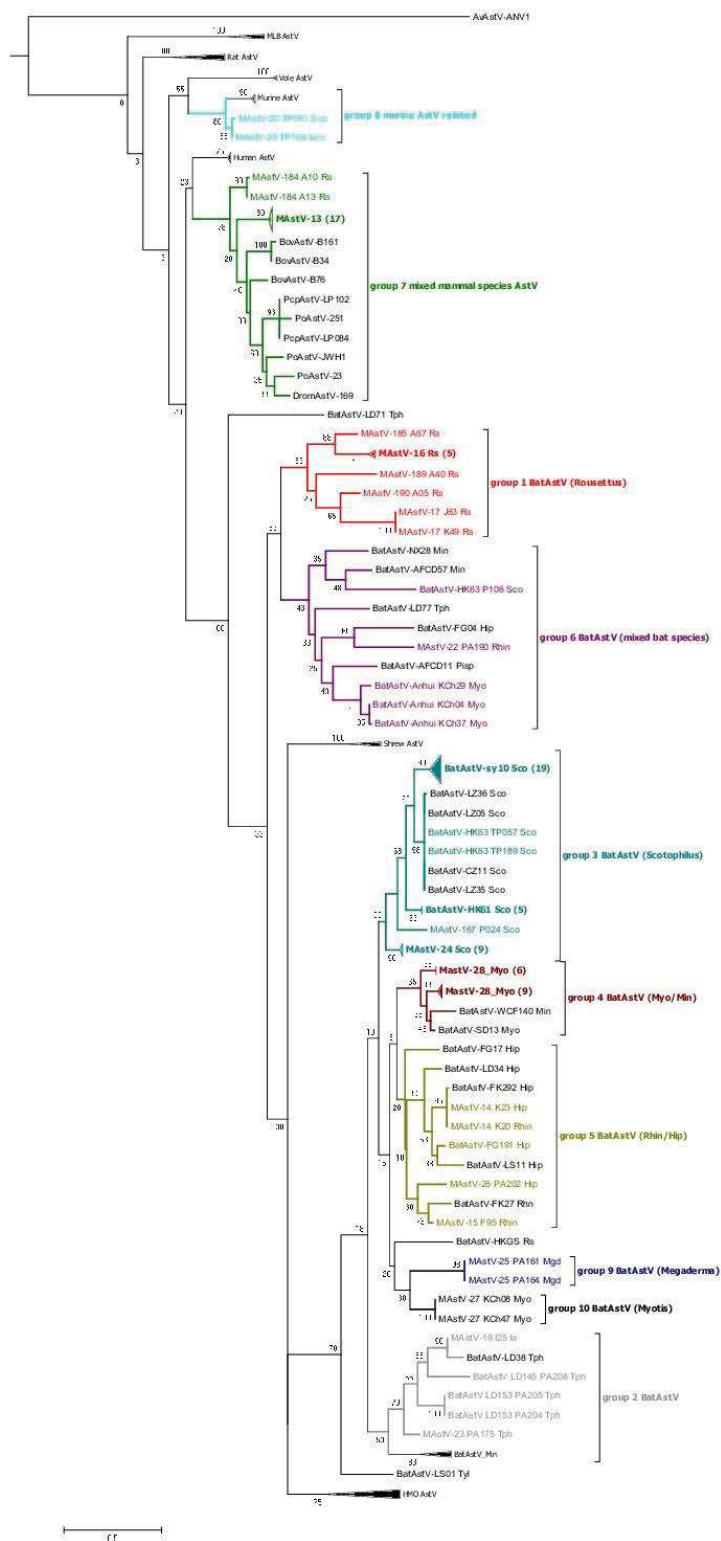
Thank you for your consideration of our manuscript.

Yours Sincerely,

Philippe Buchy (MD, PhD), Roger Frutos (PhD)

Graphical Abstracts







Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Research paper

Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia



Audrey Lacroix^a, Veasna Duong^a, Vibol Hul^a, Sorn San^b, Holl Davun^b, Keo Omaliss^c, Sokha Chea^d, Alexandre Hassanin^{e,f}, Watthana Theppangna^g, Soubanh Silithammavong^{h,i}, Kongsy Khammavong^h, Sinpakone Singhalath^h, Aneta Afelt^j, Zoe Greateorex^h, Amanda E. Fine^k, Tracey Goldstein^l, Sarah Olson^k, Damien O. Joly^{k,m}, Lucy Keatts^d, Philippe Dussart^a, Roger Frutos^{n,o,*}, Philippe Buchy^{a,p,**}

^a Institut Pasteur du Cambodge, Virology Unit, Phnom Penh, Cambodia^b National Veterinary Research Institute, Department of Animal Health and Production, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Cambodia^c Forest Administration, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Cambodia^d Wildlife Conservation Society, Cambodia^e Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), UMR 7205 MNHN CNRS UPMC, EPHE, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, France^f Muséum national d'Histoire naturelle, Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), UMR 7205 MNHN CNRS UPMC, France^g National Animal Health Laboratory, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Laos^h Wildlife Conservation Society, Laosⁱ Metabiota Inc., Vientiane, Laos^j Institute of Physical Geography, Faculty of Geography and Regional Studies, University of Warsaw, Warsaw, Poland^k Wildlife Conservation Society, Wildlife Health Program, Bronx, N.Y., USA^l One Health Institute, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, USA^m Metabiota Inc., Nanaimo, British Columbia, Canadaⁿ Cirad, UMR 17, Cirad-Ird, TA-A17/G, Montpellier, France^o Université de Montpellier, IES, UMR 5214, CNRS-UM, Montpellier, France^p GSK Vaccines R&D, 150 Beach road, # 22-00, 189720, Singapore

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2016

Received in revised form 12 November 2016

Accepted 14 November 2016

Available online 15 November 2016

Keywords:

Astroviruses

Bats

Genetic diversity

Cambodia

Lao PDR

ABSTRACT

Astroviruses are known to infect humans and a wide range of animal species, and can cause gastroenteritis in their hosts. Recent studies have reported astroviruses in bats in Europe and in several locations in China. We sampled 1876 bats from 17 genera at 45 sites from 14 and 13 provinces in Cambodia and Lao PDR respectively, and tested them for astroviruses. Our study revealed a high diversity of astroviruses among various *Yangochiroptera* and *Yinpterochiroptera* bats. Evidence for varying degrees of host restriction for astroviruses in bats was found. Furthermore, additional Pteropodid hosts were detected. The astroviruses formed distinct phylogenetic clusters within the genus *Mamastrovirus*, most closely related to other known bat astroviruses. The astrovirus sequences were found to be highly saturated indicating that phylogenetic relationships should be interpreted carefully. An astrovirus clustering in a group with other viruses from diverse hosts, including from ungulates and porcupines, was found in a *Rousettus* bat. These findings suggest that diverse astroviruses can be found in many species of mammals, including bats.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Astroviruses (astVs) are non-enveloped positive-sense single-stranded RNA viruses, with a genome size ranging from 6.4 to 7.3 kb (De Benedictis et al., 2011). They belong to the family of *Astroviridae* and are divided into two genera: *Avastrovirus* and *Mamastrovirus*. They infect birds and mammals, respectively, despite the association

between host species and astV genus has been recently evidenced to be permeable (Pankovics et al., 2015). AstVs are distributed widely and some have been identified as a cause of gastroenteritis in humans and other mammals (Koci et al., 2000; Kurtz and Lee, 1987; Matsui and Herrmann, 2003). Previous studies reported a high prevalence and genetic diversity of astroviruses in bats and rodents. AstVs have been detected in a wide variety of bat species, mostly *Yangochiroptera*, in several locations in Europe (Dufkova et al., 2015; Fischer et al., 2015; Kemenesi et al., 2014b) and China (Chu et al., 2008; Hu et al., 2014; Wu et al., 2012; Xiao et al., 2011; Zhu et al., 2009).

Chiroptera represent almost 20% of terrestrial mammals. They have been identified as a major reservoir of zoonotic viruses, including coronaviruses (Corman et al., 2014; Wang et al., 2006) and henipaviruses

* Correspondence to: R. Frutos, Cirad, UMR 17, Cirad-Ird, TA-A17/G, Montpellier, France.

** Correspondence to: P. Buchy, Institut Pasteur du Cambodge, Virology Unit, Phnom Penh, Cambodia.

E-mail addresses: roger.frutos@ies.univ-montp2.fr (R. Frutos), buchyphilippe@hotmail.com (P. Buchy).

(Field, 2009; Wild, 2009). Cambodia and Lao PDR both have a high diversity of bat species, respectively 70 and 80 species of chiroptera are present including *Yangochiroptera* and *Yinpterochiroptera* bats. Many bat species roost close to human dwellings and several of them are also hunted for food and trade (Lee et al., 2014), leading to opportunities for close contact between humans and bats which may present a risk for the transmission of potential pathogens. Circulation of several viruses has been reported in Cambodian bats including flavivirus, bunyavirus, lyssavirus, and Nipah virus (Salaün et al., 1974; Olson et al., 2002; Osborne et al., 2003; Reynes et al., 2004, 2005). Information on the presence and diversity of astVs in bats was lacking in Lao PDR and Cambodia. We therefore undertook this work in order to investigate the presence of astroviruses in bats in these two countries.

2. Material and methods

2.1. Ethics

The study was approved by the National Veterinary Research Institute and the Forest Administration Department of the Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries in Cambodia, as well as by the National Animal Health Laboratory, Department of Livestock and Fisheries, Ministry of Agriculture and Forestry in Lao PDR, and under the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of California, Davis (protocol number: 16,048). As Cambodia and Lao PDR have no ethics committee overseeing animal experimentation, animals were treated in accordance with the guidelines of the American Society of Mammalogists, and within the European Union legislation guidelines (Directive 86/609/EEC).

2.2. Collection of bat samples

Bat samples from 17 genera were collected from 45 locations in Lao PDR and Cambodia, over a 3-year period (from November 2010 to December 2013). Bat genera, or species when possible, were identified, based on morphological characteristics by field biologists and veterinarians. The sampling was carried out in two phases: Phase 1 was performed in 2010 by the Institut Pasteur in Cambodia (IPC) in collaboration with the Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN; Paris, France). Bats were captured using harp traps, stored in Mist Net bags (Ecotone, Gdynia, Poland) and humanely euthanized under supervision of the National Veterinary Research Institute in full compliance with local ethical and legal guidelines at the sampling sites in the Cambodian provinces of Ratanakiri, Stung Treng and Preah Vihear. Rectal swabs were stored in viral transport medium (VTM; containing tryptose phosphate Broth 2.95%, 145 mM of NaCl, 5% gelatin, 54 mM Amphotericin B, 106 U of penicillin-streptomycin per liter, 80 mg of gentamycin per liter [Sigma-Aldrich, Irvine, UK]). Lung and other tissue specimens (*i.e.* liver, spleen, kidney, heart) were placed in separate cryotubes. All specimens were immediately transferred into liquid nitrogen containers before being transported to the Institut Pasteur laboratory where they were stored at -80°C prior to testing. Phase 2 of sampling was performed by the Wildlife Conservation Society (WCS), as part of USAID PREDICT project, from 2011 to 2013. Bats on Cambodian guano farms are wild and free-ranging, with farmers constructing artificial roosts adjacent to their homes in order to attract bats. Farmers, who wear no protective equipment, collect guano voided onto tarpaulins or nets laid beneath the roosts. Sterile swabs were used to collect freshly voided fecal samples from tarpaulins placed under the roosts. Rectal and oral swabs and tissue samples were also collected from individual animals that had died of natural causes and were found fresh beneath bat guano farm roosts. Each collected fecal sample was considered as representative of one animal. Additionally, oral and rectal swab were collected from freshly dead bats presented by traders or for sale in restaurants or food markets. The freshness of the carcass was determined based on the appreciation of veterinarians (<48 h after being killed), and

direct information from the sellers or hunters. Phase 2 samples were immediately placed in VTM or RNA stabilization solution (RNAlater®, Qiagen). Specimens collected in VTM were immediately stored in liquid nitrogen before being transported to the laboratory and stored at -80°C prior to testing.

2.3. RNA extraction and astrovirus detection

Viral RNA from swabs, feces and from lung specimens were extracted by the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the supplier's instructions. For samples collected during phase 1, if a rectal swab and a lung were both collected from the same animal, the two samples were pooled for RNA extraction. Similarly, during phase 2, if an oral and rectal swab were both collected from one animal, the samples were pooled for RNA extraction. Pooling was implemented to facilitate the detection of other viruses than astroviruses displaying different tropism. The RNA was eluted in 60 μl of AVE buffer (Qiagen) and was used as template for reverse transcription (RT). Reverse transcription (RT) was performed using a SuperScript III kit (Invitrogen, San Diego, CA). Astrovirus RNA detection was performed by a semi-nested PCR targeting a fragment of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, using broadly reactive primers and the amplification conditions described previously by Chu et al. (2008). The visualization of a 436 bp and a 421 bp fragment after the first and second PCR round was performed by agarose gel electrophoresis. To limit the risk of contamination, RNA extraction, reverse transcription-PCR (RT-PCR), nested-PCR and gel electrophoresis were carried out in separate rooms. Negative (water) and positive (plasmids prepared by cloning the gene of interest) controls were included in each PCR run. When pooled samples tested positive, RNA from the corresponding oral, rectal or lung specimens were re-extracted and tested separately to identify the positive specimen in the pool. DNA products amplified by nested-RT-PCR were sequenced in both directions by direct Sanger sequencing in commercial facilities (Macrogen, Inc., Seoul, Korea). Amplification of longer fragments of the RdRp (ORF1b₍₂₎, ~620 bp) was performed on RNA of the positive samples, by a nested RT-PCR using the same forward primers as for the assay for astVs detection and a gene-specific reverse primer targeting the 3' end of ORF1b previously described (Chu et al., 2008). When sequencing indicated coinfections may be present (multiple nucleotide peaks seen in the chromatogram), PCR products were cloned by Macrogen, Inc., using a TOPcloner™ TA kit (Enzynomics), and 5 individual clones were selected for sequencing in order to assess clonal sequence diversity. Longer fragments of the ORF2 generated by PCR using gene-specific (Supplementary Table 1) and oligo (dT) primers, flanking the ORF2 region at the 3' end. Fragments were then sequenced by primer walking (Macrogen, Inc., Seoul, Korea).

2.4. Sequence analyses

Sequences were analyzed by CLC Genomics Workbench 3.6.1 and aligned by BioEdit 7.0.9.1. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Sequences were deposited in GenBank and accession numbers are provided in Supplementary Table 2. Alignments of the detected astrovirus sequences with a representative set of reference sequences retrieved from GenBank were performed using Seaview 4.5.4 (Gouy et al., 2010). The best tree construction model was calculated using MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Nucleic acid and protein phylogenetic trees were constructed by the Maximum Likelihood method with the LG + G model in Seaview 4.5.4 (Gouy et al., 2010) and bootstrap values were determined by 1000 replicates. For the purpose of classification, mean amino acid genetic distances of the complete capsid sequences shared by the samples that were successfully sequenced and other known astVs were calculated using the p-dist method of the MEGA 6 software. All positions containing alignment gaps were eliminated using the pairwise deletion option. To assess the robustness of the

phylogenetic analysis, nucleotide polymorphism and genome saturation were analyzed. The ratio (Ts/Tv) of observed transition (mutation from a purine nucleotide to another or a pyrimidine nucleotide to another) versus transversion (mutation for a purine nucleotide to pyrimidine one or from a pyrimidine nucleotide to purine one) was calculated as an indicator of genome saturation. Ts/Tv was calculated for indel-free regions of ORF1b and ORF2 sequences using Seaview 4.5.4 (Gouy et al., 2010). Sequence polymorphism was investigated using the DnaSP 5.10.01 package (Librado and Rozas, 2009).

2.5. Geographic data

Land cover data was obtained from GlobeLand30 service operated by the National Geomatics Center of China (NGCC, 2014). Initial data was produced in 2010 with an update in 2014. Images used for GlobeLand30 (GLC30) classification were multispectral images with a 30-meter resolution. Six classes of land cover were considered: cropland, forest, grassland, wetland, water bodies and human settlement area. Land cover structure for each sampling location of sampling is described in Supplementary Table 3. Data mapping was conducted with Quantum GIS, version 2.8.2.

3. Results

3.1. Sampling areas and sample collection

A total of 1876 animals were sampled in 14 districts in Cambodia (n = 1247 bats) and 13 districts in Lao PDR (n = 629 bats). A total of 1211 oral swabs, 1684 rectal swabs, 187 feces and 328 lung specimens were obtained from 17 genera of bats belonging to six families: 4 families from the *Yinpterochiroptera* suborder and 2 families belonging to the *Yangochiroptera* suborder (Table 1). For samples collected during phase 2, apart from the samples collected in bat guano farms, the exact original location of animals remained unknown as bats were hunted for market

trade. However, bats were always captured by hunters in areas close to the location where animals were sampled, i.e. mostly in areas at the border of deep forests, in mixed agricultural zones with sparse forests, in suburban zones close to sparse forest, in natural protected forest areas, in places close to water surfaces or in limestone karst areas with mountain forests (Supplementary Fig. 1, Supplementary Table 3). Landscape analysis around each sampling location led to a typology comprising four main groups of land cover (Supplementary Table 3, Supplementary Fig. 1): 1) Deep forest area well isolated from human settlements (sites: A5, A17, A19, A26, A30, A31, A33, A34, A35, A42, A43 and A44), 2) Isolated pockets of croplands surrounded by forest very often under fragmentation (sites: A4, A14, A18, A20, A21, A22, A23, A24, A25, A27, A28, A29, A32, A36, A37, A38, A39, A40, A41 and A45), 3) Forest edge, mixed agricultural zones with sparse forests (sites: A7, A9, A15 and A16) and 4) typical agricultural zones, villages and suburban zones, often close to highly fragmented forests (sites: A1, A2, A3, A6, A8, A10, A11, A12 and A13). For sites A1, A6, A8, A10 and A11 a key parameter was the presence of wetlands in the immediate vicinity. Almost 70% of specimens collected in Cambodia were from 4 of the 14 districts at sampling sites located in Choam Khsant, Kean Svay, Muong Russei and Kang Meas. Diversity of bats varied between sites as bats from 7 genera belonging to 5 families including *Yangochiroptera* and *Yinpterochiroptera* were sampled in the Thala Barivat district, whereas at other sampling sites, only one single genus of bat was sampled, including the lesser Asian house bat (genus *Scotophilus*) and horsfield's bat (*Myotis horsfieldii*) in the Kang Meas and the Kampong Chhnang districts, respectively.

3.2. Detection of astroviruses in bats

The number of samples from each bat genus, as well as the detection of astroviruses by semi-nested RT-PCR are shown in Table 1. Of 1876 animals tested, 100 (5.5%) were positive for an astV. Overall, 21 fecal specimens, 4 oral swabs and 76 rectal swabs tested positive (Table 1). In one

Table 1
RT-PCR detection of astroviruses in bats from Cambodia and Lao PDR.

	Total	Cambodia		Lao PDR	
	No. of bats (percentage (%) of positive)	No. of bats (no. of positive)	Location	No. of bats (no. of positive)	Location
Total	1876 (5.3)	1247 (68)		629 (32)	
<i>Yangochiroptera</i>	781 (8.2)	749 (63)		32 (1)	
<i>Emballonuridae</i>	147 (2.7)	147 (4)		0	
<i>Taphozous</i> sp.	147 (2.7)	147 (4)	<u>A1, A11, A33</u>	0	
<i>Vespertilionidae</i>	634 (9.5)	602 (59)		32 (1)	
<i>Hesperoptenus</i> sp.	0.1 (0)	1 (0)	A43	0	
<i>Laio</i>	32 (3.1)	0		32 (1)	<u>A20</u>
<i>Myotis horsfieldii</i>	47 (42.6)	47 (20)	<u>A6</u>	0	
<i>Pipistrellus</i> sp.	29 (0)	29 (0)	A5	0	
<i>Scotophilus</i> sp.	524 (7.4)	524 (39)	<u>A8, A3, A2, A11, A10</u>	0	
<i>Tylonycteris</i> sp.	1 (0)	1 (0)	A36	0	
<i>Yinpterochiroptera</i>	1095 (3.3)	498 (5)		597 (31)	
<i>Hipposideridae</i>	37 (5.4)	4 (1)		33 (1)	
<i>Aselliscus</i> sp.	7 (0)	0		7 (0)	A26
<i>Hipposideros</i> sp.	30 (6.7)	4 (1)	A32, <u>A33</u>	26 (1)	A21, A22, <u>A24</u> , A25
<i>Megadermatidae</i>	21 (9.5)	21 (2)	0	0	
<i>Megaderma lyra</i>	21 (9.5)	21 (2)	<u>A33</u> , A42		
<i>Pteropodidae</i>	882 (3)	420 (1)	462 (26)		
<i>Cynopterus</i> sp.	340 (0)	321 (0)	A35, A12, A13, A14, A30, A31, A33, A36, A37, A38, A39, A40, A41, A42, A43, A45, A7, A9	19 (0)	A22, A24, A25, A27, A28, A29
<i>Eonycteris</i> sp.	79 (3.8)	28 (0)	A38, A39, A40, A41	51 (3)	A18, <u>A22</u> , <u>A24</u> , A25
<i>Macroglossus</i> sp.	22 (0)	21 (0)	A12, A9	1 (0)	A25
<i>Megaerops</i> sp.	98 (0)	29 (0)	A35, A30, A31, A37, A38, A40	69 (0)	A15, A16, A17, A18, A24, A25, A27, A28
<i>Pteropus</i> sp.	10 (0)	10 (0)	A13	0	
<i>Rousettus</i> sp.	333 (7.2)	11 (1)	A35, A12, A13, <u>A33</u> , A38 <u>A22</u> , A23, <u>A24</u> , A25	322 (23)	A16, A17, <u>A18</u> , <u>A19</u>
<i>Rhinolophidae</i>	155 (3.2)	53 (1)		102 (4)	
<i>Rhinolophus</i> sp.	155 (3.2)	53 (1)	A31, <u>A33</u> , A38, A42, A43, A44, A32	102 (4)	<u>A24</u> , <u>A26</u>

Bat families are shown in bold.

Sites where bats tested positive for astroviruses are underlined and bold.

bat, an astV was found in both oral and rectal samples. Astrovirus-positive bats were detected in 13 of the 45 sampling sites in 11 districts: 6 provinces in Lao and 5 in Cambodia. Nine of 17 bat genera were found to be positive for astroviruses. Among the positive bats sampled in phase 2 ($n = 90/1547$), 76% ($n = 68$) were destined for human consumption and 24% ($n = 22$) were from bat guano farms, i.e. artificial roosts erected to facilitate bat guano collection for use as agricultural fertilizer. The proportion positive among genera varied from 2.7% to 42.5%. The highest number of positives was found in *Myotis* bats. Differences were found within one bat genus when they were sampled at different sites, e.g. the proportion of positives from the genus *Scotophilus* in a guano farm from Bakan district (site reference A8) was 26.3% (15/70), whereas only 5.3% (4/80) were positive from *Scotophilus* bats from Kang Meas district (site reference A3). Some genera (e.g. *Cynopterus*), with large sample size ($n = 340$ respectively) were found to be negative, while other genera (e.g. *Myotis*, *Megaderma*) with small sampling numbers ($n = 47$ and $n = 21$ respectively) tested positive (Table 1). In Cambodia, most of the astrovirus-positive animals (65/68) were *Yangochiroptera* bats, whereas in Lao PDR 27 out of the 32 astVs were found in *Yinpterochiroptera*, including bats from genera *Rousettus* and *Eonycteris*. Differences in the proportion of positives were seen both in host genera and between sampling sites. For example, in Thala Barivat District (reference site A43, Supplementary Fig. 1), 7 astVs were detected in 4 different bat genera (*Taphozous*, *Hipposideros*, *Rousettus* and *Rhinolophus*) whereas at the Kampong Chhnang site (reference site A6, Supplementary Fig. 1), 23 astVs were detected, all in the *Myotis* genus (Table 1).

3.3. Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses of 112 amino acid fragments of the RdRp gene revealed that all the astrovirus sequences belonged to the *Mamastrovirus* genus (Fig. 1). A similar topology was observed using alignments of the corresponding 336 nucleic acid fragments (Supplementary Fig. 2). The virus sequences fell into 10 monophyletic groups, most related to astV sequences previously detected in bats, with the exception of groups 7 and 8 which included astroviruses detected in multiple host and murine species (Fig. 1). A characteristic of this phylogenetic analysis is the very low bootstrap values (Fig. 1) indicative of a lack of population structure, possibly due to the short sequences, and therefore must be interpreted cautiously.

3.4. Host/astrovirus specificity

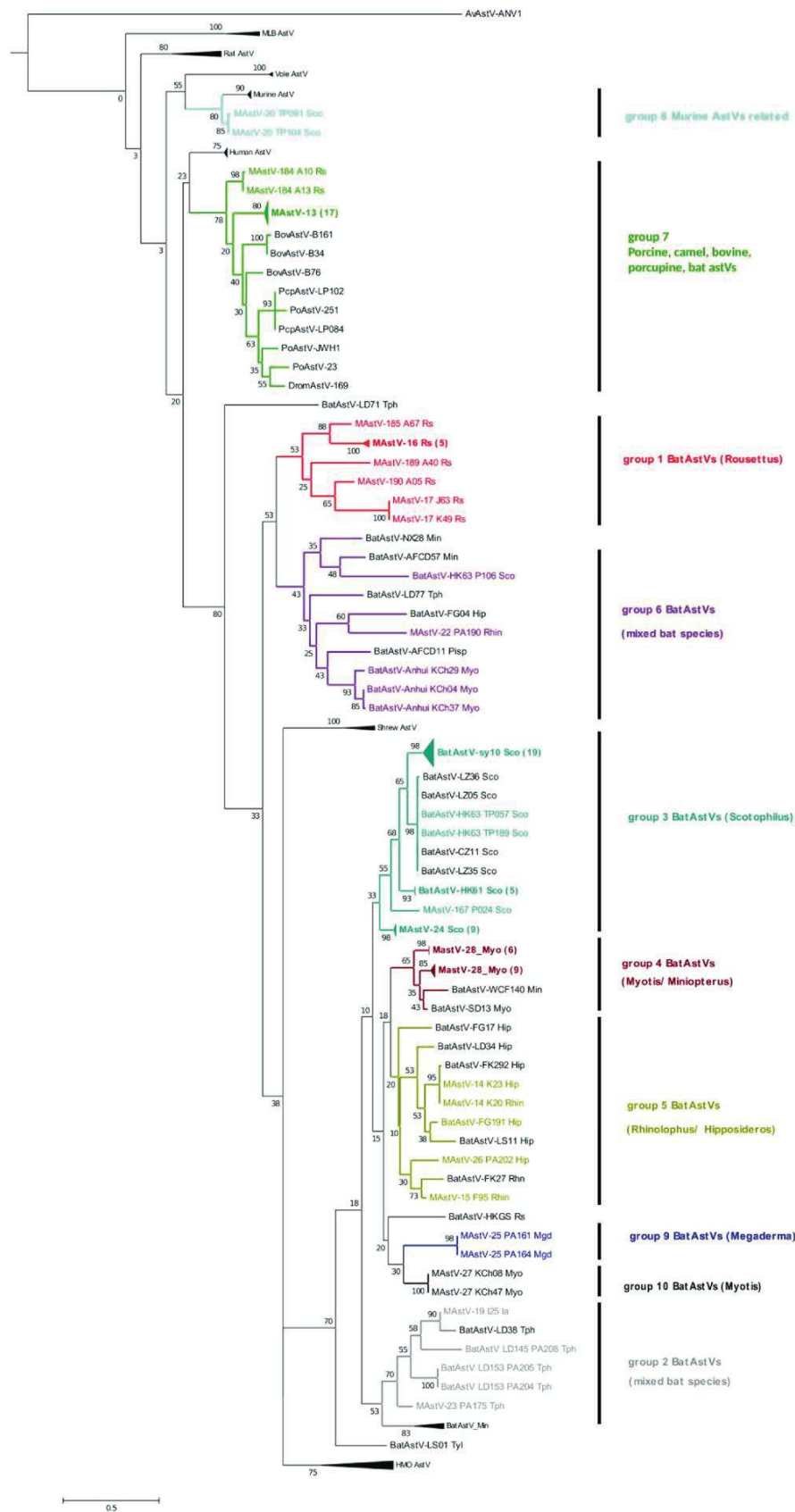
Astrovirus sequences showed varying degrees of host specificity. For example, astV sequences clustering in groups 1, 3, 4, 8, 9 and 10 were restricted to only one bat genus, i.e. *Rousettus* for group 1, *Myotis* for groups 4 and 10, *Megaderma* for group 9, *Scotophilus* for groups 3 and 8, whereas sequences from groups 2, 5, 6 and 7 were each detected in several bat genera (Fig. 1), whereas in groups 2, 5 and 6, sequences belong to insectivorous bat genera only (*Ia*, *Taphozous*, *Rhinolophus*, *Hipposideros*). Group 3 contained 36 astV sequences all detected in lesser Asian house bats (*Scotophilus* sp.) from three Cambodian provinces (site references A1, A2, A3, A8) and closely related to bat astVs previously found in the same genus in Hainan Island, China (Hu et al., 2014). Astroviruses detected in *Scotophilus* ($n = 1$), *Myotis* ($n = 3$) and *Rhinolophus* ($n = 1$) fell into group 6, which also contained sequences detected previously in insectivorous bats (Zhu et al., 2009; Hu et al., 2014). In this group, sequences detected *Scotophilus* genus (BatAstV-Anhui_KC04, KC29, KC37) formed their own branches, closely related

to the strain BatAstV-Anhui, also detected in *Myotis*, showing 83.5 to 91.8% and 98.2 to 99.1% of nucleotide and amino acid identities. The sequences BatAstV-HK63_P106 and MAstV-22_PA190, detected in a lesser Asian bat and a horseshoe bat respectively, were distant from the other group 6 bat astVs. BatAstV-HK63_P106 showed only 64% of amino acid similarities with the BatAstV-NX28 sequence detected in a *Miniopterus* bat in China, and MAstV-22_PA190 displayed 68% of amino acid similarities with the BatAstV-AFCD11, found in a pipistrelle from Hong Kong. Group 9 also presented a high divergence with 77.4% of identity in the amino acid sequence with the closest astV of the tree (i.e. MAstV-24_P039_Sco). Interestingly, 19 sequences from viruses identified from 3 genera of *Yinpterochiroptera* bats (*Rousettus*, *Eonycteris* and *Rhinolophus*) in Lao PDR and Cambodia, fell into group 7, showing 78.3%, 86.8% of amino acid identity with astVs previously detected in ungulate and porcupine hosts (Hu et al., 2014; Reuter et al., 2011; Shan et al., 2012, 2011) (Fig. 2). Moreover, two sequences identified in lesser Asian bats (*Scotophilus* sp.) in Cambodia (MAstV-20_TP104 and MAstV-20_TP089) clustered with murine astVs, showing 84 to 87% of amino acid sequence identity. The average pairwise similarities of amino acids within/among bat astV sequences from the groups 1 and 6 were the lowest, with 73.6% and 71.7% (Supplementary Table 4). Additionally, bat astV sequences from monophyletic group 1 related, displayed 50% to 63.6% of amino acid similarities to other MAstVs in the partial RdRp sequence (Supplementary Table 4). Astrovirus sequences were detected in bats sampled in various environments. All the sequences detected in bats from Cambodian guano farms from Bakan (site reference A8) and Kang Meas (site reference A2) districts, belong to the group 3 and were all detected in fecal samples. Heterogeneities were found in terms of location, date of bat collection and host genus, depending on the group of astV sequences. Sequences from 4 different groups (2, 6, 7 and 9) were detected in bats roosting in the same environment in the Thala Barivat District (site references A33, A34) in a suburban environment close to sparse forest. In Kampong Chhnang Province, Horsfield's bats (genus *Myotis*) sampled from the same colony (A6 on Fig. 1) at the same time, were found to carry astVs belonging to groups 4, 6 and 10. Moreover, astV sequences detected in different sampling locations at different times and/or in different host genus, were shown to be identical or highly similar. For example, in the group 7, 2 sequences from the genus *Rousettus* bats collected in December 2010 and January 2012 (i.e. MAstV-13_PA178 and MAstV-13_A11) at two sites 530 km apart (i.e., site references A34 (Cambodia) and A24 (Lao PDR)), had 100% identity in nucleotide and amino acid sequences. Within the same group, the sequences MAstV-13 × 60 and MAstV-13_A09, detected both in a *Rhinolophus* and a *Rousettus* from the Lao districts of Vieng Thong and Vang Vieng, in December 2011 and January 2012 respectively, also displayed 100% sequences identity.

3.5. Polymorphism and genome saturation assessment

After additional RNA extraction, only 55 out of the 100 positive samples showed a successful amplification using the RT-PCR detection assay (Chu et al., 2008), and were used for additional sequencing. For 29 samples, longer ORF1b fragments were obtained, ranging from 609 bp and 701 bp. Given the lack of structure in the phylogenetic trees, nucleotide polymorphism and saturation assessment were conducted on indel-free fragments from ORF1b and ORF2 sequences. Sequences of ORF1b₍₂₎ fragments, ranging from 609 bp and 701 bp were included in the analysis ($n = 29$). Thus, the three batches of sequences (named ORF1b₍₁₎, ORF1b₍₂₎ and ORF2) contained fragments of respectively 246, 582 and 716 nucleotides in length. Polymorphism analysis indicated the

Fig. 1. Relationship of astroviruses constructed using a multiple alignment of 112 amino acids of the partial RdRp gene of detected astroviruses and selected members of *Mamastrovirus*. The tree was constructed using the Neighbor-Joining method. Bootstrap values were determined by 1000 replicates. PoAstV: Porcine astrovirus (astV); BovAstV: bovine astV; HAstV: human astV; DromAstV: dromedary astV; PcpAstV: porcupine astV; AvAstV: avian astV. The genus of bat host is given for Bat astroviruses, i.e. Min: *Miniopterus*; Hip: *Hipposideros*; Tph: *Taphozous*; Pip: *Pipistrellus*; Tyl: *Tylonycteris*; Sco: *Scotophilus*; Rs: *Rousettus*; Myo: *Myotis*; Mgd: *Megaderma*; Eon: *Eonycteris*; Ia: *Ia*; Rhin: *Rhinolophus*. For each detected sequence, the strain, sample name and bat genus were included in the nomenclature. For clarity, strains named "PREDICT-MAstV-xx" are abbreviated as "MAstV-xx" in the tree. Accession numbers of the sequences are listed in the Supplementary Table 2. An avian astrovirus (AB033998) is used as outgroup.



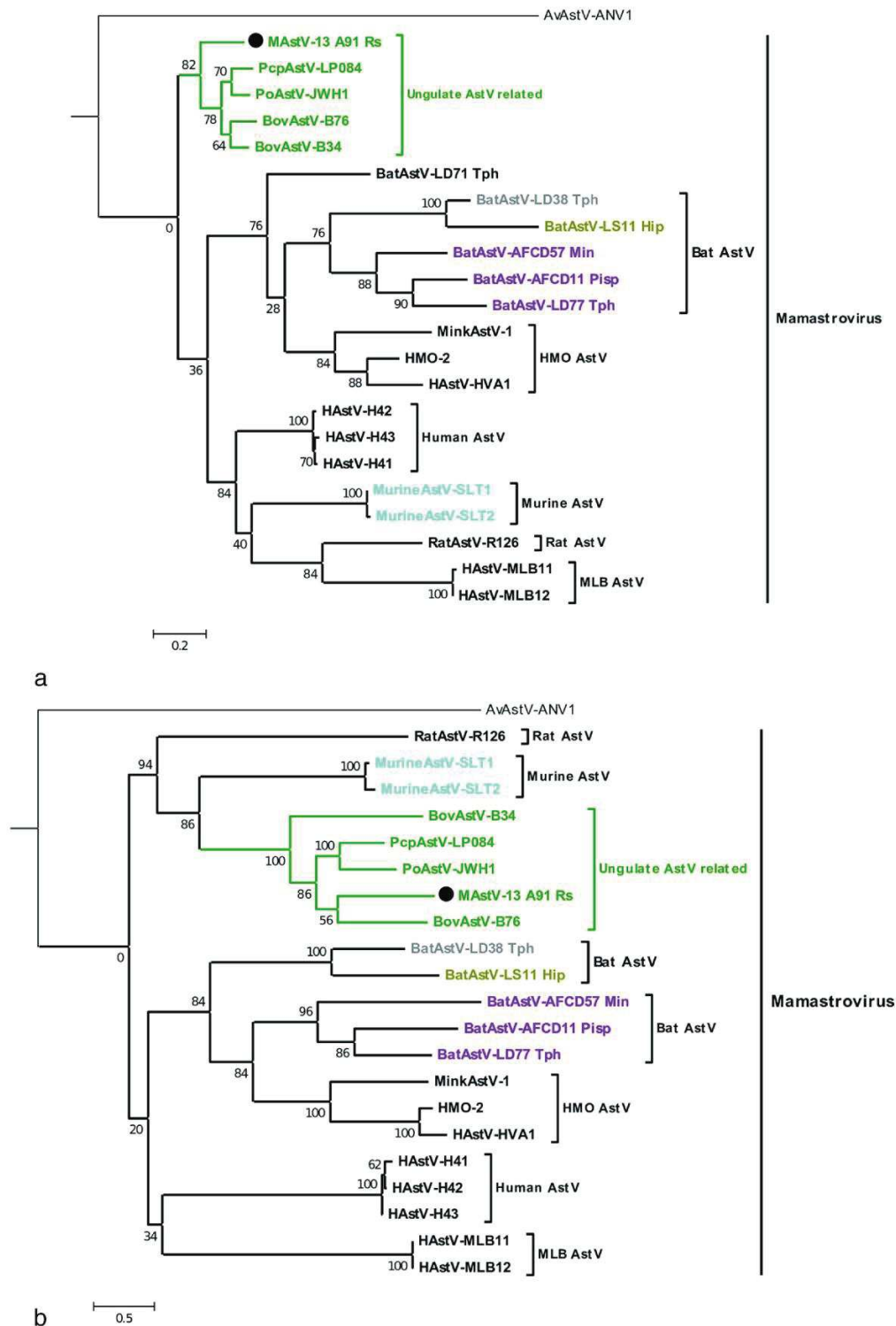


Fig. 2. Relationship of the partial ORF1b and ORF2 sequences of the bat astrovirus PREDICT-MAstV-13_A91_Rs to other species of astroviruses. a) Relationship of the partial ORF1b (~230 aa) sequence of the bat astrovirus PREDICT-MAstV-13_A91_Rs to other species of astroviruses. b) Relationship of the partial ORF2 (~380 aa) sequence of the bat astrovirus PREDICT-MAstV-13_A91_Rs to other species of astroviruses. Alignments were based on the encoded amino acid sequences. Trees were constructed using the Neighbor-joining method. Five other bat astrovirus sequences (BatAstV-LD38, BatAstV-LS11 and BatAstV-AFCD11, BatAstV-AFCD57, BatAstV-LD77) corresponding to groups 2, 5, and 6 in Fig. 1, are included. The strain PREDICT-MAstV-13_A91_Rs is marked with a bullet. Astroviruses are abbreviated as follows: PoAstV: Porcine astrovirus (astV); BatAstV: bat astV; BovAstV: bovine astVs; HAstV: human astV; DromAstV: dromadery astV; PcpAstV: porcupine astV; AvAstV: avian astV. The genus of bat host is given for Bat astroviruses, i.e. Min: *Miniopterus*; Hip: *Hipposideros*; Tph: *Taphozous*; Pip: *Pipistrellus*. An avian astrovirus (AB033998) was used as outgroup.

presence of differing trends. A very high level of polymorphism was detected on both ORF1b and ORF2 (Table 2). The number of mutated sites was high and represented 80.5%, 70% and 84.2% of the nucleotides analyzed for ORF1b₍₁₎, ORF1b₍₂₎ and ORF2, respectively. The number of mutations observed (η) represented more than twice the number of polymorphic sites (Table 2). This indicates that the populations analyzed are not growing or emerging populations. Mutated codons represented 42.7%, 60.3% and 34.9% of the codons analyzed for ORF1b₍₁₎, ORF1b₍₂₎ and ORF2, respectively. However, in face of this high level of polymorphism, the number of synonymous mutations was also very high, indicative of a negative selective pressure. Accordingly, the Ka/Ks ratio was found to be low for both genes. The transition/transversion ratio (Ts/Tv) was also very low (<0.8) indicating a highly saturated genome (Table 2). No bias was observed in the percentage of A, T, C and G bases. All these data indicate that some astVs are under high mutational dynamics leading to full genome saturation and to a strong negative, or purifying, selective pressure. Thirty of the 100 sequences of partial ORF1b had multiple nucleotides at the same position. The amplicons were therefore cloned to further investigate the nucleic acid polymorphism. A total of 17 amplicons were successfully cloned. For 12 positive samples, a single cloned daughter sequence was obtained whereas for 5 samples, more than one differing sequence was obtained after cloning. The sequences obtained after cloning showed varying degrees of distance with the consensus sequences generated by direct sequencing of the amplicons, ranging from 0% to 44.7% for nucleotide sequences and from 0 and 43.5% for amino acid sequences. When more than one different clone was found, the average sequence difference among them varied from 5.2% to 43.1% and from 4.8% to 43.5%, for nucleotides and amino acids sequences, respectively (Supplementary Table 5).

3.6. Genomic features of the strain PREDICT-MAstV-13_A91

Partial genome sequencing was successful for only one sample, corresponding to the sequence PREDICT-MAstV-13_A91. A longer sequence of 3123 nucleotides of the ORF1b gene and the complete ORF2 region was obtained for one newly detected virus (PREDICT-MAstV-13_A91, group 7) (Supplementary Fig. 2). ORF2 contained a region encoding a 774 amino acid capsid protein, a 3' untranslated region (UTR) followed by a poly-A tail. An overlap of 8 nucleotides (ATGGCTAG) between the stop codon of ORF1b and the start codon of

ORF2, specific to mamastrovirus genomes (De Benedictis et al., 2011) was found. To investigate the relationship of PREDICT-MAstV-13 to other mamastroviruses, the region covering 699 nt of ORF1b and the complete capsid gene on ORF2 were compared to sequences from various representative mamastroviruses retrieved from GenBank (HMO strains, human astVs, porcine astV, bovine astVs, porcupine astV, rat astV, bat astVs and murine astVs) (Fig. 2). ORF2 sequences of BatAstV available in GenBank were limited, nevertheless some sequences from group 2 (BatAstV-LD38), group 5 (BatAstV-LS11) and group 6 (BatAstV-AFCD11, BatAstV-AFCD57 and BatAstV-LD77) were included in the analysis. Both ORF1b and ORF2 sequences' analyses confirmed the presence of astrovirus PREDICT-MAstV-13_A91 within group 7 along with ungulate and porcupine astVs (Fig. 2), showing a relative distance from sequences with the other astVs from group 7 (68.5 to 78% amino acid similarity on partial ORF1b sequences). Based on complete capsid gene sequence (ORF2), A91 shared 41.2% to 49.4% of amino acid similarity with other group 7 members, and displayed <32.1% with the other mamastroviruses from the tree, which is the criterion for astrovirus species definition, considering the ICTV taxonomic proposal on Mamastrovirus (2010.018aV).

4. Discussion

This work highlights the apparent high diversity of astroviruses circulating among bat populations in Lao PDR and Cambodia. This finding was consistent with previous reports (Chu et al., 2008; Zhu et al., 2009; Xiao et al., 2011; Wu et al., 2012; Hu et al., 2014; Kemenesi et al., 2014a, 2014b; Dufkova et al., 2015). In some sites, multiple viruses were found in bats from a single genus and collected during one sampling session, within one habitat, whereas in other cases bats from several different genera, sampled in different habitats at various times were found to have just one astV. Our results were consistent with previous studies in China, revealing that the circulation of astVs is widely spread among Chiroptera and does not show strict host restriction (Chu et al., 2008; Zhu et al., 2009; Xiao et al., 2011). These results vary from those reported in Germany where host-specific viruses have been described in insectivorous bats (Fischer et al., 2015). Host specificity in insectivorous bats and variation between regions and species is therefore an aspect to further investigate. Some insectivorous bat species are leaving close to human habitat and may thus represent a risk for the

Table 2
Polymorphism and saturation data calculated from partial ORF1b₍₁₎, ORF1b₍₂₎ and ORF2 sequences.

N	Hp	Nt	S(%)	η	Pa(%)	Si(%)	MC(%)	Na(%)	Ns(%)	Ka/Ks	Ts/Tv	Pi	%A	%C	%G	%T	
ORF1b ₍₁₎ ^a	178	144	246	198 ^(80.5)	448	183 ^(92.4)	15 ^(7.6)	35 ^(42.7)	5 ^(4.3)	30 ^(85.7)	0.097	0.728	0.73	29	19.4	21.3	30.4
ORF1b ₍₂₎ ^a	29	29	582	407 ⁽⁷⁰⁾	746	366 ⁽⁹⁰⁾	41 ^(10.1)	117 ^(60.3)	23 ^(19.7)	94 ^(80.4)	0.187	0.789	0.32	27	19.8	21.8	31.3
ORF2 ^b	32	30	716	603 ^(84.2)	1328	570 ^(94.5)	33 ^(5.5)	83 ^(34.9)	9 ^(22.9)	64 ^(77.1)	0.147	0.662	0.44	23.9	23.1	25.4	27.6

N: Number of sequences.

Hp: Number of haplotypes.

Nt: Sequence size in nucleotides.

S: Number of mutated sites.

η : Number of mutations.

Pa: Number of parsimony informative sites.

Si: Number of singletons.

MC: Number of mutated codons.

Na: Number of non-synonymous mutations.

Ns: Number of synonymous mutations.

Ka/Ks: Ka/Ks ratio.

Ts/Tv: Transition/Transversion ratio.

Pi: Average number of nucleotide differences per site between two sequences.

%A: Overall percentage of adenosine.

%C: Overall percentage of cytosine.

%G: Overall percentage of guanosine.

%T: Overall percentage of thymidine.

^a Owing to the presence of indels in the ORF sequences, statistics were calculated on regions free of indels.

^b Due to the important frequency of indels in the protein, polymorphism parameters were calculated based on 716 nucleotides corresponding to the first cleaved protein at the N terminal position only (homologous to the VP34 protein for Human astVs).

transmission of viruses to humans and domestic animals. One astV strain was repeatedly detected during different sampling periods, the group 7 astV sequences detected in bats from different Cambodian and Lao districts between 2010 and 2012. Drexler et al. (2011) also reported one strain in one bat colony at different times over a three-year period. Seasonality may be related to the breeding season, correlating with more numerous contacts between bats during the mating period, as well as a lower immunocompetence in females during gestation and lactating stages (Christe et al., 2000; Plowright et al., 2008; Baker et al., 2013), which could be important for viral shedding. Unfortunately, the lack of longitudinal sampling in our study did not allow us to explore the effect of seasonality on viral shedding, an aspect that would be valuable in future studies.

A high polymorphism was observed among astV sequences within a single group while displaying a level of divergence with other mammal astVs, i.e. astV from groups 1 and 6. Furthermore, twenty-two identified sequences fell into groups 7 and 8, which comprise ungulate and murine astVs. To date, this is the first report of astV strains related to diverse hosts including ungulate and porcupine, and murine astVs, in frugivorous and insectivorous bats. This suggests that bats can host many diverse astV sequences that may be found in more virus groups than previously thought. However, given that only short sequences were analyzed from a conserved region of the RdRp gene, interpretations regarding relatedness to other viruses must be considered with caution. Bosch et al. (2010) proposed new classification criteria for astV species in the latest ICTV proposal (2010.018aV), based on the ORF2 region encoding the capsid protein. ICTV recognizes a new species of astV if the complete ORF2 sequence shows >32.1% of difference in the amino acid with the closest sequence (Bosch et al., 2010). Although several sequences were original, only one sample, i.e. PREDICT-MAstV-13_A91, met the dual requirement of a full length ORF2 sequence displaying >32.1% difference at the amino acid level. Considering these ICTV criteria for astV systematics, molecular analyses on the ORF2 region suggest that astV PREDICT-MAstV-13_A91 is a new species (Pringle, 2014). Following ICTV guidelines, we thus propose to name this astV: PREDICT MAstV-13/LAP11-A0091/2011.

As suggested by previous reports (Lukashov and Goudsmit, 2002; van Hemert et al., 2007b), the genome of astV is highly saturated making phylogenetic and genetic diversity analyses difficult to interpret. A genome is saturated when all possibilities of mutations have been exploited and there is therefore no further linear correlation between the accumulation of mutations and time. As a consequence, phylogenies are blurred and weak, trees are poorly structured and genotyping is not reliable as there is an overall loss of significance. A similar situation was demonstrated with human rhinoviruses (Naughtin et al., 2015). Saturation also causes the molecular clock to be overestimated and leads to estimated segregation events to have occurred far earlier than they effectively did (Bromham and Penny, 2003). AstV sequences seem to be exposed to two different trends: a high level of mutations which leads to extensive genome saturation and, also, a strong negative selection pressure leading to high conservation of the amino acid sequences, and an evolution of the codon usage which was shown to be host-driven (van Hemert et al., 2007b). Such an evolution could also be explained with a quasi-species model (Lauring and Andino, 2010). One can thus expect to simultaneously see a high mutation level, conserved proteins and host-specific variations which are all the traits displayed by astVs described in this work. In such a model, the consensus sequence is imposed by the host through selection imposed on variants present in the sequence (van Hemert et al., 2007a). The simultaneous presence of different clone sequences could be due to the presence of a co-infection, hyperpolymorphism within the same astV strain or a result of quasi species model of evolution. Host specificity in the quasi species model is not host restriction or limitation, but instead the mark of the host replication system on the viral progeny.

Apart from one astV belonging to group 7, sequencing attempts of ORF2 regions of other positive samples were unsuccessful. Several hypotheses could explain the difficulties encountered. First, the quality of viral genetic material in PCR-positive samples may be questionable. Since we found numerous positive samples which retested negative after an additional RNA extraction procedure, we can assume the viral load was low or the viral RNA too damaged, and additional thaw may have further damaged the RNA, to obtain better and longer sequence fragments. Human and several mammal (porcine, bovine) and avian astVs have been isolated and amplified in cell culture in order to provide a larger amount of high quality viral genetic material (Lee and Kurtz, 1981; Shimizu et al., 1990; Woode et al., 1985). To date, this technique has remained unsuccessful for bat astVs (De Benedictis et al., 2011), which may explain the limited number of available ORF2 references for bat astVs in GenBank. ORF2 is known to be highly divergent among astV sequences, even among bat astVs from the same cluster (Chu et al., 2008; Zhu et al., 2009), thus the development of the consensus or specific primers to amplify regions of interest may be difficult.

Bat genera where astV sequences were detected, roost in various environments, such as natural caves, old buildings, old disused wells, (*Eonycteris*, *Rousettus*, *Taphozous*, *Megaderma*, *Rhinolophus*), karst environment (*Ia*), nearby forest or orchards (*Eonycteris*, *Rousettus*) or in water areas, where food resources can be found (*Scotophilus*, *Myotis*) (Kunz and Fenton, 2005). Despite the fact that they do not share same direct food sources, the spatial overlap of feeding areas and temporary night co-roosting between bats from different genera may facilitate the exchange of viruses. This was already suggested with coronavirus infection among bats that were displaying different feeding and roosting behaviors, while sharing the same habitat, i.e. in hipposiderid and rousette in China, and in *Cynopterus* and *Scotophilus* bats in Thailand (Lau et al., 2012; Tang et al., 2006; Wacharapluesadee et al., 2015). As a result, more investigations are needed to understand the correlation between interspecific bat behavior and the potential transmission of astV sequences.

Besides bat hosts, the human-bat interface may be important to consider when examining astV infection in bats. Cambodia and Lao PDR have undergone substantial environmental change associated with agricultural development and suburban growth in the last fifty years (WWF, 2013). These changes affect natural habitats and therefore the distribution of bats, leading them to be closer to humans. This can be exacerbated by the high tolerance for habitat modification of certain bat genera that easily adapt to disturbed agricultural lands (*Rousettus*, *Eonycteris*, *Hipposideros*, *Rhinolophus*) or even adopt roosting in human dwellings (*Myotis*, *Scotophilus*) (Kunz and Fenton, 2005; Bates et al., 2008a, 2008b; Bates and Helgen, 2008; Csorba et al., 2008; Francis et al., 2008; Rosell-Ambal et al., 2008; Walston et al., 2008). This might facilitate increased contact between humans and bats and therefore, increase the risk of potential transmission of astVs to humans.

Most of the positive samples were from rectal swabs and feces, which was consistent with previous reports (Chu et al., 2008). Moreover, most of the positive bats were sampled either in guano farms or bats hunted and sold for food. These results suggest that the risk of transmission to humans through the fecal route may exist, especially through guano farming or when bats are handled after being hunted (Thi et al., 2014) in areas where they are sold in markets or provide food resources (Lee et al., 2014). In this study, the health status of the bats was unknown, and no study to date has reported clinical signs associated with astV infection in bats (Chu et al., 2008; Xiao et al., 2011). This is also the case for bat species that may carry zoonotic viruses such as henipa, filo or lyssa viruses (Mackenzie and Field, 2004; Leroy et al., 2005; Banyard et al., 2014). Thus, without a better understanding of the risks to humans associated with bat astV infection, there is a need for rural communities exposed to bats to be aware of the general potential risk of virus transmission associated with close contact, and improved guidance on how to handle the animals and reduce such

risks. There is also a need for continued surveillance for the circulation of viruses in bats and to monitor for the risk of transmission to humans.

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.meegid.2016.11.013.

Conflict of interest

Philippe Buchy is currently an employee of GSK vaccines.

Acknowledgements

This study was made possible by the generous support of the American people through the United States Agency for International Development (USAID) Emerging Pandemic Threats PREDICT project (co-operative agreement number GHN-A-00-09-00010-00). We thank the governments of Cambodia and Lao PDR for permission to conduct this study. We thank WCS teams and all the students who helped collect field samples. We also thank Dara Kong and Serey Roth Long for their technician support in the laboratory diagnostics. Thanks also to Neil Furey, from the Center for Biodiversity Conservation of the Royal University of Phnom Penh, for his help and advice on species identification. We also thank Sarah Olson for her help in extracting, organizing and providing the sample data (species, sample type, sampling location) from the phase 2 sample collection performed by WCS as part of the PREDICT project.

References

- Baker, M.L., Schountz, T., Wang, L.F., 2013. Antiviral Immune Responses of Bats: A Review. *Zoonoses Public Health* 60, 104–116.
- Banyard, A.C., Evans, J.S., Luo, T.R., Fooks, A.R., 2014. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Virus* 6:2974–2990. <http://dx.doi.org/10.3390/v6082974>.
- Bates, P., Bumrungsri, S., Francis, C., Csorba, G., 2008a. *Hipposideros armiger* [WWW Document]. IUCN red list threat. Species 2008 ET10110A3162617. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T10110A3162617> (URL, accessed 9.21.16).
- Bates, P., Helgen, K., 2008. *Rousettus leschenaultii* [WWW Document]. IUCN red list threat. Species 2008 ET19756A9011055. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T19756A9011055> (URL, accessed 9.21.16).
- Bates, P., Kingston, T., Francis, C., Rosell-Ambal, G., Heaney, L., Gonzales, J.C., Molur, S., Srinivasulu, C., 2008b. *Scotophilus kuhlii* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species 2008 ET20068A9142479. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T20068A9142479> (URL, accessed 9.21.16).
- Bosch, A., Guix, S., Krishna, N.K., Méndez, E., Monroe, S.S., Pantin-Jackwood, M., Schultz-Cherry, S., 2010. Nineteen New Species in the Genus *Mamastrovirus* in the *Astroviridae* Family. *ICTV*.
- Bromham, L., Penny, D., 2003. The modern molecular clock. *Nat. Rev. Genet.* 4, 216–224.
- Christe, P., Arlettaz, R., Vogel, P., 2000. Variation in intensity of a parasitic mite (*Spinturnix myotis*) in relation to the reproductive cycle and immunocompetence of its bat host (*Myotis myotis*). *Ecol. Lett.* 3, 207–212.
- Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2008. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J. Virol.* 82, 9107–9114.
- Corman, V.M., Ihete, N.L., Richards, L.R., Schoeman, M.C., Preiser, W., Drosten, C., Drexler, J.F., 2014. Rooting the phylogenetic tree of middle east respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J. Virol.* 88, 11297–11303.
- Csorba, G., Rosell-Ambal, G., Ingle, N., 2008. *Rousettus amplexicaudatus* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species 2008 ET19754A9010480. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T19754A9010480> (URL, accessed 11.4.16).
- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G., 2011. Astrovirus infections in humans and animals – molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 11, 1529–1544.
- Drexler, J.F., Corman, V.M., Wegner, T., Taten, A.F., Zerbinati, R.M., Gloza-Rausch, F., Seebens, A., Müller, M.A., Drosten, C., 2011. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 449–456.
- Dufkova, L., Strakova, P., Šímarová, J., Salát, J., Moutlíková, R., Chudimský, T., Bartonička, T., Nowotny, N., Růžek, D., 2015. Detection of diverse novel bat Astrovirus sequences in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 15, 518–521.
- Field, H.E., 2009. Bats and emerging zoonoses: henipaviruses and SARS. *Zoonoses Public Health* 56, 278–284.
- Fischer, K., Zeus, V., Kwasnitschka, L., Kerth, G., Haase, M., Groschup, M.H., Balkema-Buschmann, A., 2015. Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 37, 108–116.
- Francis, C., Rosell-Ambal, G., Tabaranza, B., Carino, P., Helgen, K., Molur, S., Srinivasulu, C., 2008. *Eonycteris spelaea* [WWW Document]. IUCN red list threat. Species 2008 ET7787A12850087. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T7787A12850087> (URL, accessed 11.4.16).
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
- Hu, B., Chmura, A.A., Li, J., Zhu, G., Desmond, J.S., Zhang, Y., Zhang, W., Epstein, J.H., Daszak, P., Shi, Z., 2014. Detection of diverse novel astroviruses from small mammals in China. *J. Gen. Virol.* (vir.0.067686–0).
- Kemenesi, G., Dallos, B., Görföl, T., Boldogh, S., Estók, P., Kurucz, K., Kutas, A., Földes, F., Oldal, M., Németh, V., Martella, V., Bányai, K., Jakab, F., 2014a. Molecular Survey of RNA Viruses in Hungarian Bats: Discovering Novel Astroviruses, Coronaviruses, and Caliciviruses.
- Kemenesi, G., Dallos, B., Görföl, T., Boldogh, S., Estók, P., Kurucz, K., Oldal, M., Németh, V., Madai, M., Bányai, K., Jakab, F., 2014b. Novel European lineages of bat astroviruses identified in Hungary. *Acta Virol.* 58, 95–98.
- Koci, M.D., Seal, B.S., Schultz-Cherry, S., 2000. Molecular characterization of an avian astrovirus. *J. Virol.* 74, 6173–6177.
- Kunz, T.H., Fenton, M.B., 2005. *Bat Ecology*. University of Chicago Press.
- Kurtz, J.B., Lee, T.W., 1987. Astroviruses: human and animal. *CIBA Found. Symp.* 128, 92–107.
- Lau, S.K.P., Li, K.S.M., Tsang, A.K.L., Shek, C.-T., Wang, M., Choi, G.K.Y., Guo, R., Wong, B.H.L., Poon, R.W.S., Lam, C.S.F., Wang, S.Y.H., Fan, R.Y.Y., Chan, K.-H., Zheng, B.-J., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., 2012. Recent transmission of a novel alphacoronavirus, bat coronavirus HKU10, from Leschenault's rousettes to Pomona leaf-nosed bats: first evidence of interspecies transmission of coronavirus between bats of different suborders. *J. Virol.* 86, 11906–11918.
- Lauring, A.S., Andino, R., 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 6, e1001005.
- Lee, T.M., Sigouin, A., Pinedo-Vasquez, M., Nasi, R., 2014. The Harvest of Wildlife for Bushmeat and Traditional Medicine in East, South and Southeast Asia: Current Knowledge Base, Challenges, Opportunities and Areas for Future Research. Center for International Forestry Research (CIFOR), Bogor, Indonesia.
- Lee, T.W., Kurtz, J.B., 1981. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *J. Gen. Virol.* 57, 421–424.
- Leroy, E., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J., Gonzalez, J.-P., Swanepoel, R., 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438, 575–576.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Lukashov, V.V., Goudsmit, J., 2002. Evolutionary relationships among *Astroviridae*. *J. Gen. Virol.* 83, 1397–1405.
- Mackenzie, J.S., Field, H.E., 2004. Emerging encephalitogenic viruses: lyssaviruses and henipaviruses transmitted by frugivorous bats. *Arch. Virol. Suppl.* 97–111.
- Matsui, S.M., Herrmann, J.E., 2003. Astroviruses. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Naughtin, M., Sareth, R., Sentilhes, A.-C., Vong, S., Joffret, M.-L., Cornillot, E., Deubel, V., Delpeyroux, F., Frutos, R., Buchy, P., 2015. Genetic diversity of human rhinoviruses in Cambodia during a three-year period reveals novel genetic types. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 35, 42–49.
- National Geomatics Center of China (NGCC), 2014. 30 meter Global land cover dataset, product description. <http://www.globallandcover.com/GLC30Download/index.aspx>.
- Olson, J.G., Rupprecht, C., Rollin, P.E., An, U.S., Niezgoda, M., Clemons, T., Walston, J., Ksiazek, T.G., 2002. Antibodies to Nipah-like virus in bats (*Pteropus* spp.). *Cambodia. Emerg. Infect. Dis.* 8, 987–988.
- Osborne, J.C., Rupprecht, C.E., Olson, J.G., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Niezgoda, M., Goldsmith, C.S., An, U.S., Nichol, S.T., 2003. Isolation of Kaeng Khoi virus from dead *Chaerephon plicata* bats in Cambodia. *J. Gen. Virol.* 84, 2685–2689.
- Pankovics, P., Boros, A., Kiss, T., Delwart, E., Reuter, G., 2015. Detection of a mammalian-like astrovirus in bird, European roller (*Coracias garrulus*). *Infect. Genet. Evol.* 34, 114–121.
- Plowright, R.K., Field, H.E., Smith, C., Divljan, A., Palmer, C., Tabor, G., Daszak, P., Foley, J.E., 2008. Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc. Biol. Sci.* 275, 861–869.
- Pringle, C.R., 2014. The universal system of virus taxonomy of the international committee on virus taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the sixth ICTV report in 1995. *Arch. Virol.* 143, 203–210.
- Reynes, J.M., Molia, S., Audry, L., Hout, S., Ngien, S., Walston, J., Bourhy, H., 2004. Serologic evidence of lyssavirus infection in bats, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2231–2234.
- Reynes, J.-M., Counor, D., Ong, S., Faure, C., Seng, V., Molia, S., Walston, J., Georges-Courbot, M.C., Deubel, V., Sarthou, J.-L., 2005. Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1042–1047.
- Rosell-Ambal, G., Tabaranza, B., Heaney, L., Gonzales, J.C., Molur, S., Srinivasulu, C., 2008. *Myotis horsfieldii* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species 2008 ET14166A4413659. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T14166A4413659> (URL, accessed 9.21.16).
- Reuter, G., Pankovics, P., Boros, A., 2011. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. *Arch. Virol.* 156, 125–128.
- Salaün, J.J., Klein, J.M., Hébrard, G., 1974. Un nouveau virus Phnom-Penh bat virus, isolé au Cambodge chez une chauve-souris frugivore, *Cynopterus brachyotis angulatus*, Miller, 1898. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 125 A, 485–495.
- Shan, T., Li, L., Simmonds, P., Wang, C., Moeser, A., Delwart, E., 2011. The fecal virome of pigs on a high-density farm. *J. Virol.* 85, 11697–11708.
- Shan, T., Wang, C., Tong, W., Zheng, H., Hua, X., Yang, S., Guo, Y., Zhang, W., Tong, G., 2012. Complete Genome of a Novel Porcine Astrovirus. *J. Virol.* 86, 13820–13821.
- Shimizu, M., Shirai, J., Narita, M., Yamane, T., 1990. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J. Clin. Microbiol.* 28, 201–206.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2725–2729.

- Tang, X.C., Zhang, J.X., Zhang, S.Y., Wang, P., Fan, X.H., Li, L.F., Li, G., Dong, B.Q., Liu, W., Cheung, C.L., Xu, K.M., Song, W.J., Vijaykrishna, D., Poon, L.L.M., Peiris, J.S.M., Smith, G.J.D., Chen, H., Guan, Y., 2006. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J. Virol.* 80, 7481–7490.
- Thi, S., Furey, N.M., Jurgens, J.A., 2014. Effect of bat guano on the growth of five economically important plant species. *J. Trop. Agric.* 52, 169–173.
- van Hemert, F.J., Berkhout, B., Lukashov, V.V., 2007a. Host-related nucleotide composition and codon usage as driving forces in the recent evolution of the *Astroviridae*. *Virology* 361, 447–454.
- van Hemert, F.J., Lukashov, V.V., Berkhout, B., 2007b. Different rates of (non-)synonymous mutations in astrovirus genes; correlation with gene function. *Viol. J.* 4, 25.
- Wacharapluesadee, S., Duengkae, P., Rodpan, A., Kaewpom, T., Maneerorn, P., Kanchanasaka, B., Yingsakmongkon, S., Sittidetboripat, N., Chareesaen, C., Khlangsap, N., Pidthong, A., Leadprathom, K., Ghai, S., Epstein, J.H., Daszak, P., Olival, K.J., Blair, P.J., Callahan, M.V., Hemachudha, T., 2015. Diversity of coronavirus in bats from eastern Thailand. *Virol. J.* 12, 57.
- Walston, J., Kingston, T., Hutson, A.M., 2008. *Rhinolophus Affinis* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species. URL The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T19522A8952553 (accessed 9.21.16).
- Wang, L.-F., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., 2006. Review of bats and SARS. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1834–1840.
- Wild, T.F., 2009. Henipaviruses: a new family of emerging Paramyxoviruses. *Pathol. Biol.* 57, 188–196.
- Woode, G.N., Gourley, N.E., Pohlenz, J.F., Liebler, E.M., Mathews, S.L., Hutchinson, M.P., 1985. Serotypes of bovine astrovirus. *J. Clin. Microbiol.* 22, 668–670.
- Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J., Liu, L., Xue, Y., Wang, J., Yang, F., Zhang, S., Jin, Q., 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J. Virol.* 86, 10999–11012.
- WWF, 2013. Ecosystems in the Greater Mekong: Past Trends, Current Status, Possible Futures. World Wide Fund For Nature, Greater Mekong, Bangkok, Thailand.
- Xiao, J., Li, J., Hu, G., Chen, Z., Wu, Y., Chen, Y., Chen, Z., Liao, Y., Zhou, J., Ke, X., Ma, L., Liu, S., Zhou, J., Dai, Y., Chen, H., Yu, S., Chen, Q., 2011. Isolation and phylogenetic characterization of bat astroviruses in southern China. *Arch. Virol.* 156, 1415–1423.
- Zhu, H.C., Chu, D.K.W., Liu, W., Dong, B.Q., Zhang, S.Y., Zhang, J.X., Li, L.F., Vijaykrishna, D., Smith, G.J.D., Chen, H.L., Poon, L.L.M., Peiris, J.S.M., Guan, Y., 2009. Detection of diverse astroviruses from bats in China. *J. Gen. Virol.* 90, 883–887.

Supplementary Table 1: Primers used for the amplification of ORF2 fragment of ungulate-related astrovirus.

Primer	Sequence (5' to 3')
AstroV_ongulate_Fwd1	TSCAGAAGATTACAACAACGCTCGG
AstroV_ongulate_Fwd2	ATGCTTCARRGACAATTGARAACGAGC
Astrov_ongulate_Rev1	GCCCGCTTGGCAGTRAATCAGCTG
AstroV_ongulate_Rev2	GGCCTATCACCTAGGRSCGCY

Supplementary Table 2: Accession numbers of astrovirus sequences deposited in GenBank.

Genbank Accession	Isolate	Short names for sequence analysis*
KX858462	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0002	MAstV-28_KCh02_Myo
KX858461	Bat Astrovirus Myr/Anhui/A900/2005/KH11KCh1-0004	BatAstV-Anhui_KCh04_Myo
KX858451	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0007	MAstV-28_KCh07_Myo
KX858456	Astrovirus_PREDICT MAstV-27/KH11KCh1-0008	MAstV-27_KCh08_Myo
KX858465	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0009	MAstV-28_KCh09_Myo
KX858459	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0012	MAstV-28_KCh12_Myo
KX858460	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0016	MAstV-28_KCh16_Myo
KX858453	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0021	MAstV-28_KCh21_Myo
KX858437	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0023	MAstV-28_KCh23_Myo
KX858447	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0024	MAstV-28_KCh24_Myo
KX858427	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0026	MAstV-28_KCh26_Myo
KX858450	Bat Astrovirus Myr/Anhui/A900/2005/KH11KCh1-0029	BatAstV-Anhui_KCh29_Myo
KX858428	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0030	MAstV-28_KCh30_Myo
KX858439	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0033	MAstV-28_KCh33_Myo
KX858440	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0036	MAstV-28_KCh36_Myo
KX858449	Bat Astrovirus Myr/Anhui/A900/2005/KH11KCh1-0037	BatAstV-Anhui_KCh37_Myo
KX858444	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0039	MAstV-28_KCh39_Myo
KX858430	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0041	MAstV-28_KCh41_Myo
KX858431	Astrovirus_PREDICT MAstV-28/KH11KCh1-0044	MAstV-28_KCh44_Myo
KX858426	Astrovirus_PREDICT MAstV-27/KH11KCh1-0047	MAstV-27_KCh47_Myo
KX858528	Bat Astrovirus Ms/HK61/CHN/2007/KHP13-OTP1-0041	BatAstV-HK61_TP041_Sco
KX858529	Bat Astrovirus Ms/HK61/CHN/2007/KHP13-OTP1-0044	BatAstV-HK61_TP044_Sco
KX858530	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-OTP1-0047	BatAstV-sy10_TP047_Sco
KX858533	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-OTP1-0048	BatAstV-sy10_TP048_Sco

KX858531	Bat Astrovirus Sk/HK63/CHN/2007/KHP13-OTP1-0057	BatAstV-HK63_TP057_Sco
KX858532	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-OTP1-0059	BatAstV-sy10_TP059_Sco
KX858384	Astrovirus_PREDICT MAstV-20/KHP13OTP2-0088	MAstV-20_TP088_Sco
KX858388	Astrovirus_PREDICT MAstV-20/KHP13OTP2-0091	MAstV-20_TP091_Sco
KX858389	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13OTP2-0093	BatAstV-sy10_TP093_Sco
KX858390	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13OTP2-0095	BatAstV-sy10_TP095_Sco
KX858391	Astrovirus_PREDICT MAstV-20/KHP13OTP2-0104	MAstV-20_TP104_Sco
KX858392	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13OTP2-0106	BatAstV-sy10_TP106_Sco
KX858385	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13OTP2-0113	BatAstV-sy10_TP113_Sco
KX858386	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13OTP2-0122	MAstV-24_TP122_Sco
KX858387	Bat Astrovirus Sk/HK63/CHN/2007/KHP13OTP2-0289	BatAstV-HK63_TP198_Sco
KX858506	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13-PTR1-0001	MAstV-24_P001_Sco
KX858501	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13-PTR1-0004	MAstV-24_P004_Sco
KX858507	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-PTR1-0006	BatAstV-sy10_P006_Sco
KX858500	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13-PTR1-0008	MAstV-24_P008_Sco
KX858505	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13-PTR1-0009	MAstV-24_P009_Sco
KX858498	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13-PTR1-0020	MAstV-24_P020_Sco
KX858508	Bat Astrovirus Ms/HK61/CHN/2007/KHP13-PTR1-0023	BatAstV-HK61_P023_Sco
KX858497	Astrovirus_PREDICT MAstV-167/KHP13-PTR1-0024	MAstV-167_P024_Sco
KX858509	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13-PTR1-0030	MAstV-24_P030_Sco
KX858499	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-PTR1-0037	BatAstV-sy10_P037_Sco
KX858502	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13-PTR1-0039	MAstV-24_P039_Sco
KX858504	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-PTR1-0043	BatAstV-sy10_P043_Sco
KX858496	Bat Astrovirus Ms/HK61/CHN/2007/KHP13-PTR1-0044	BatAstV-HK61_P044_Sco
KX858503	Bat Astrovirus Ms/HK61/CHN/2007/KHP13-PTR1-0067	BatAstV-HK61_P067_Sco
KX858493	Astrovirus_PREDICT MAstV-24/KHP13-PTR1-0103	MAstV-24_P103_Sco
KX858494	Bat Astrovirus Sk/HK63/CHN/2007/KHP13-PTR1-0106	BatAstV-HK63_P106_Sco
KX858495	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-PTR1-0110	BatAstV-sy10_P110_Sco

KX858526	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-VRB1-0024	BatAstV-sy10_Vb24_Sco
KX858524	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-VRB1-0032	BatAstV-sy10_Vb32_Sco
KX858525	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-VRB1-0033	BatAstV-sy10_Vb33_Sco
KX858522	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-VRM1-0022	BatAstV-sy10_Vm22_Sco
KX858520	Bat Astrovirus Ms/HK61/CHN/2007/KHP13-VRM1-0037	BatAstV-HK61_Vm37_Sco
KX858521	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-VRM1-0070	BatAstV-sy10_Vm70_Sco
KX858523	Bat Astrovirus Ms/sy10/CHN/2008/KHP13-VRM1-0076	BatAstV-sy10_Vm76_Sco
KX858362	Astrovirus_PREDICT MAsV-189/LAP11-A0040	MAsV-189_A40_Rs
KX858366	Astrovirus_PREDICT MAsV-186/LAP11-A0066	MAsV-186_A66_Rs
KX858367	Astrovirus_PREDICT MAsV-185/LAP11-A0067	MAsV-185_A67_Rs
KX858368	Astrovirus_PREDICT MAsV-16/LAP11-A0071	MAsV-16_A71_Rs
KX858364	Astrovirus_PREDICT MAsV-16/LAP11-A0073	MAsV-16_A73_Rs
KX858363	Astrovirus_PREDICT MAsV-16/LAP11-A0074	MAsV-16_A74_Rs
KX858365	Astrovirus_PREDICT MAsV-13/LAP11-A0091	MAsV-13_A91_Rs
KX858349	Astrovirus_PREDICT MAsV-15/LAP11-F0095	MAsV-15_F95_Rhin
KX858352	Astrovirus_PREDICT MAsV-13/LAP11-J0050	MAsV-13_J50_Eon
KX858353	Astrovirus_PREDICT MAsV-13/LAP11-J0054	MAsV-13_J54_Rs
KX858358	Astrovirus_PREDICT MAsV-17/LAP11-J0063	MAsV-17_J63_Rs
KX858359	Astrovirus_PREDICT MAsV-13/LAP11-J0065	MAsV-13_J65_Rs
KX858360	Astrovirus_PREDICT MAsV-13/LAP11-J0066	MAsV-13_J66_Rs
KX858354	Astrovirus_PREDICT MAsV-13/LAP11-J0078	MAsV-13_J78_Rs
KX858355	Astrovirus_PREDICT MAsV-13/LAP11-J0088	MAsV-13_J88_Rs
KX858357	Astrovirus_PREDICT MAsV-16/LAP11-J0091	MAsV-16_J91_Rs
KX858356	Astrovirus_PREDICT MAsV-16/LAP11-J0093	MAsV-16_J93_Rs
KX858370	Astrovirus_PREDICT MAsV-14/LAP11-K0020	MAsV-14_K20_Rhin
KX858371	Astrovirus_PREDICT MAsV-14/LAP11-K0023	MAsV-14_K23_Hip
KX858372	Astrovirus_PREDICT MAsV-17/LAP11-K0049	MAsV-17_K49_Rs
KX858369	Astrovirus_PREDICT MAsV-13/LAP11-K0066	MAsV-13_K66_Eon

KX858351	Astrovirus_PREDICT MAstV-13/LAP11-X0060	MAstV-13_X60_Rhin
KX858350	Astrovirus_PREDICT MAstV-13/LAP11-X0061	MAstV-13_X61_Rhin
KX858376	Astrovirus_PREDICT MAstV-190/LAP12-A0005	MAstV-190_A05_Rs
KX858375	Astrovirus_PREDICT MAstV-13/LAP12-A0008	MAstV-13_A08_Eon
KX858378	Astrovirus_PREDICT MAstV-13/LAP12-A0009	MAstV-13_A09_Rs
KX858374	Astrovirus_PREDICT MAstV-184/LAP12-A0010	MAstV-184_A10_Rs
KX858379	Astrovirus_PREDICT MAstV-13/LAP12-A0011	MAstV-13_A11_Rs
KX858373	Astrovirus_PREDICT MAstV-13/LAP12-A0012	MAstV-13_A12_Rs
KX858377	Astrovirus_PREDICT MAstV-184/LAP12-A0013	MAstV-184_A13_Rs
KX858380	Astrovirus_PREDICT MAstV-13/LAP12-A0021	MAstV-13_A21_Rs
KX858361	Mamastrovirus-19/LAP12-I1-0025	MAstV-19_I25_Ia
KX858513	MAstrovirus_PREDICT MAstV-25/PV1206.PA161	MAstV-25_PA161_Mgd
KX858517	Astrovirus_PREDICT MAstV-25/PV1206.PA164	MAstV-25_PA164_Mgd
KX858515	Astrovirus_PREDICT MAstV-23/PV1206.PA175	MAstV-23_PA175_Tph
KX858518	Astrovirus_PREDICT MAstV-13/PV1206.PA178	MAstV-13_PA178_Rs
KX858516	Astrovirus_PREDICT MAstV-22/PV1206.PA190	MAstV-22_PA190_Rhin
KX858511	Astrovirus_PREDICT MAstV-26/PV1206.PA202	MAstV-26_PA202_Hip
KX858512	Bat Astrovirus Tm/Guangxi/LD153/2007/PV1206.PA204	BatAstV_LD153_PA204_Tph
KX858514	Bat Astrovirus Tm/Guangxi/LD153/2007/PV1206.PA205	BatAstV_LD153_PA205_Tph
KX858510	Bat Astrovirus Tm/Guangxi/LD145/2007/PV1206.PA208	BatAstV_LD145_PA208_Tph
KX645667	PREDICT MAstV-13/LAP11-A0091/2011.	PREDICT-MAstV-13_A91_Rs

* For the sequence analysis, strains named "Astrovirus_PREDICT-MAstV-xx" are abbreviated as "MAstV-xx_bat genus". The genus of bat host is given as follows, Min: *Miniopterus*; Hip: *Hipposideros*; Tph: *Taphozous*; Pip: *Pipistrellus*; Tyl: *Tylonycteris*; Sco: *Scotophilus*; Rs: *Rousettus*; Myo: *Myotis*; Mgd: *Megaderma*; Eon: *Eonycteris*; Ia: *Ia*; Rhin: *Rhinolophus*.

Supplementary Table 3: Sampling sites.

Country	Province	District	Site code
Cambodia	Kandal	Kean Svay	A1
Cambodia	Kampong Cham	Kang Meas	A2
Cambodia	Kampong Cham	Kang Meas	A3
Cambodia	Mondulkiri	Kaev Seima	A4
Cambodia	Mondulkiri	Kaev Seima	A5
Cambodia	Kampong Chhnang	Kampong Chhnang	A6
Cambodia	Battambang	Moung Russei	A7
Cambodia	Pursat	Bakan	A8
Cambodia	Battambang	Som Lot	A9
Cambodia	Battambang	Moung Russei	A10
Cambodia	Battambang	Moung Russei	A11
Cambodia	Battambang	Banan	A12
Cambodia	Siem Reap	Siem Reap	A13
Cambodia	Preah Vihear	Choam Khsant	A14
Cambodia	Preah Vihear	Choam Khsant	A30
Cambodia	Preah Vihear	Choam Khsant	A31
Cambodia	Preah Vihear	Choam Khsant	A32
Cambodia	Stung Treng	Thala Barivat	A33
Cambodia	Stung Treng	Thala Barivat	A34
Cambodia	Stung Treng	Thala Barivat	A35
Cambodia	Ratanakiri	Ta Veang	A36

Cambodia	Ratanakiri	Ou Chum	A37
Cambodia	Ratanakiri	Ou Chum	A38
Cambodia	Ratanakiri	Veun Sai	A39
Cambodia	Ratanakiri	Veun Sai	A40
Cambodia	Ratanakiri	Veun Sai	A41
Cambodia	Preah Vihear	Choam Khsant	A42
Cambodia	Preah Vihear	Choam Khsant	A43
Cambodia	Preah Vihear	Choam Khsant	A44
Cambodia	Preah Vihear	Choam Khsant	A45
Lao PDR	Champasak	Batieng Chaleunsouk	A15
Lao PDR	Saravan	Saravan	A16
Lao PDR	Khammouane	Xebangfay	A17
Lao PDR	Khammouane	Xebangfay	A18
Lao PDR	Khammouane	Mahaxai	A19
Lao PDR	Khammouane	Gnommalath	A20
Lao PDR	Khammouane	Hinboon	A21
Lao PDR	Vientiane	Meuang Feuang	A22
Lao PDR	Vientiane	Meuang Feuang	A23
Lao PDR	Vientiane	Vang Vieng	A24
Lao PDR	Vientiane	Kasi	A25
Lao PDR	Houaphan	Vieng Thong	A26
Lao PDR	Luang namtha	Luang namtha	A27
Lao PDR	Luang namtha	Mueang sing	A28
Lao PDR	Phongsaly	Boun Tay	A29

Supplementary Table 4. Percentage of similarities based on pairwise comparison of amino acid sequence identities of the partial RdRp gene fragments between the bat astroviruses detected and other available mammal astroviruses. The groups defined in the previous tree analysis (Figure 2) are used in this table. For each group of detected sequences, the number (No) of detected sequences is given, as well as the similarities of sequences within the group, and between various mammal astVs. Similarities of amino acid (aa) sequences are given in percentage (%).

		group 1	group 2	group 3	group 4	group 5	group 6	group 7	group 8	group 9	group 10
	No of detected astV sequences	10	5	36	15	4	5	19	2	2	2
	average percentage of aa sequence similarities within the group	73,6	78,3	84,4	90,9	80,2	71,7	89,4	99	100	100
	[range of aa similarities] AA_sim range	[62,24; 100]	[75,26; 98,99]	[69,7; 100]	[83,84; 100]	[73,74; 100]	[56,7; 100]	[56,99; 100]			
Host	Name of astV strain*										
Bat	BatAstV-ADCF11	63,6	58,5	56,5	55,2	53,3	71,0	54,7	59,2	56,1	54,1
Bat	BatAstV-JX18	53,4	66,9	86,6	69,3	68,7	55,4	55,7	61,4	71,7	69,7
Bat	BatAstV-LD34	56,0	68,9	71,5	77,4	80,6	55,8	53,4	56,0	70,7	73,7
Bat	BatAstV-LD38	56,7	78,2	65,1	66,2	66,4	55,0	57,4	56,0	62,6	66,7
Bat	BatAstV-WCF140	50,9	63,0	68,1	78,8	71,2	52,8	52,4	54,9	70,7	71,7
Bovine	BovAstV-B34	56,9	54,0	55,9	49,0	51,3	54,7	79,4	63,6	51,1	54,3
Human	HMO-4	51,2	53,5	56,1	55,5	55,1	52,8	43,1	50,5	51,5	51,5
Human	HAstV-H11	61,7	55,6	58,6	58,0	56,0	57,1	65,7	62,5	56,5	57,6
Human	HAstV-H12	61,7	55,6	58,6	58,0	56,0	57,1	65,7	61,4	56,5	57,6
Human	HAstV-H43	61,8	54,9	58,0	56,9	55,2	56,6	66,3	63,6	55,4	56,5
Human	HAstV-H61	61,7	54,7	57,0	55,1	54,9	57,3	68,2	61,4	55,4	57,6
Human	HAstV-H8	60,7	54,5	57,5	56,9	54,9	55,8	64,6	61,4	55,4	56,5

Human	HAstV-MLB11	57,2	49,9	51,1	49,7	48,9	53,8	56,0	60,1	55,6	50,0
Murine	MurineAstV-SLT1	55,3	54,7	58,8	52,8	54,9	56,9	63,1	83,2	56,5	53,3
Porcine	PoAstV-JWH1	57,3	55,7	56,9	54,3	53,7	55,2	73,7	61,4	53,2	57,4
Rat	RatAstV-R126	50,2	49,6	49,4	45,9	46,2	50,9	60,6	67,6	51,6	49,5
Shrew	ShrewAstV-FG102	55,8	58,1	58,9	55,4	56,8	57,9	51,8	57,1	60,6	57,6
Vole	VolAstV-FG004	51,8	55,7	57,2	52,5	53,5	52,5	59,4	64,3	55,4	54,3

* the names of astV strain follow the nomenclature used in the phylogenetic tree (figure 2). Accession numbers corresponding to the acid nucleic sequences in GenBank, are : BatAstV-ADCF11 (EU847145), BatAstV-JX18 (KJ571406), BatAstV-LD34 (KJ571422), BatAstV-LD38 (FJ571065), BatAstV-WCF140 (EU847146), BovAstV-B34 (HQ916315), HAstV-H11 (AY720892), HAstV-H12(L23513), HAstV-H43 (HM237363), HAstV-H61 (AF260508), HAstV-H8 (GQ415660), HMO-4 (GQ415660), HAstV-MLB11 (FJ222451), MurineAstV-SLT1 (JX544743), PoAstV-JWH1 (HQ647383), RatAstV-R126 (HM450382), ShrewAstV-FG102 (KJ571479), VolAstV-FG004 (KJ571436)

Supplementary Table 5: Distance and similarities in nucleotide (nt) and amino acid (aa) astrovirus cloned sequences.

sequence A	Sequence B	nt distance	Std. err*	nt similarities	aa distance	Std. err	aa similarities
Kn36_clone1	Kn36_clone2	0,345	0,024	0,65	0,375	0,041	0,625
Kn36_clone1	Kn36_230bp	0,361	0,023	0,64	0,344	0,041	0,656
Kn36_clone2	Kn36_230bp	0,330	0,023	0,67	0,336	0,039	0,664
Kn44_clone3	Kn44_230bp	0,052	0,011	0,95	0,048	0,018	0,952
Kn44_cl1	Kn44_clone3	0,257	0,021	0,74	0,246	0,038	0,754
Kn44_cl1	Kn44_230bp	0,265	0,021	0,73	0,254	0,037	0,746
Kn44_clone2	Kn44_230bp	0,413	0,025	0,59	0,435	0,044	0,565
Kn44_cl1	Kn44_clone2	0,418	0,024	0,58	0,387	0,043	0,613
Kn44_clone2	Kn44_clone3	0,431	0,025	0,57	0,435	0,044	0,565
T041_230bp	T041_clone1	0,003	0,003	1,00	0,000 0	,000	1,000
T041_230bp	T041_clone2	0,253	0,021	0,75	0,135	0,029	0,865
T041_clone1	T041_clone2	0,250	0,021	0,75	0,135	0,029	0,865
T044_230bp	T044_clone1	0,003	0,002	1,00	0,000	0,000	1,000
T044_clone1	T044_clone2	0,266	0,020	0,73	0,181	0,033	0,819

T044_230bp	T044_clone2	0,269	0,020	0,73	0,181	0,033	0,819
T095_230bp	T095_clone1	0,000	0,000	1,00	0,000	0,000	1,000
T095_230bp	T095_clone2	0,250	0,021	0,75	0,180	0,033	0,82
T095_clone1	T095_clone2	0,250	0,021	0,75	0,180	0,033	0,82
Kn41_230bp	Kn41_clone	0,003	0,003	0,997	0,009	0,009	0,991
T057_230bp	T057_clone	0	0	1,000	0,000	0,000	1,000
T122_230bp	T122_clone	0	0	1,000	0,000	0,000	1,000
Vm37_230bp	Vm37_clone	0	0	1,000	0,000	0,000	1,000
T104_230bp	T104_clone	0,003	0,003	0,997	0,000	0,000	1,000
T189_230bp	T189_clone	0,006	0,005	0,994	0,009	0,009	0,991
Vm22_230bp	Vm22_clone	0,006	0,004	0,994	0,009	0,009	0,991
Kn24_230bp	Kn24_clone	0,006	0,004	0,994	0,019	0,013	0,981
J66_230bp	J66_clone	0,013	0,006	0,987	0,000	0,000	1,000
A10_230bp	A10_clone	0,029	0,009	0,971	0,029	0,016	0,971
P030_230bp	P030_clone	0,044	0,011	0,956	0,028	0,016	0,972
P208_230bp	P208_clone	0,447	0,029	0,553	0,410	0,048	0,590

***Standard error**

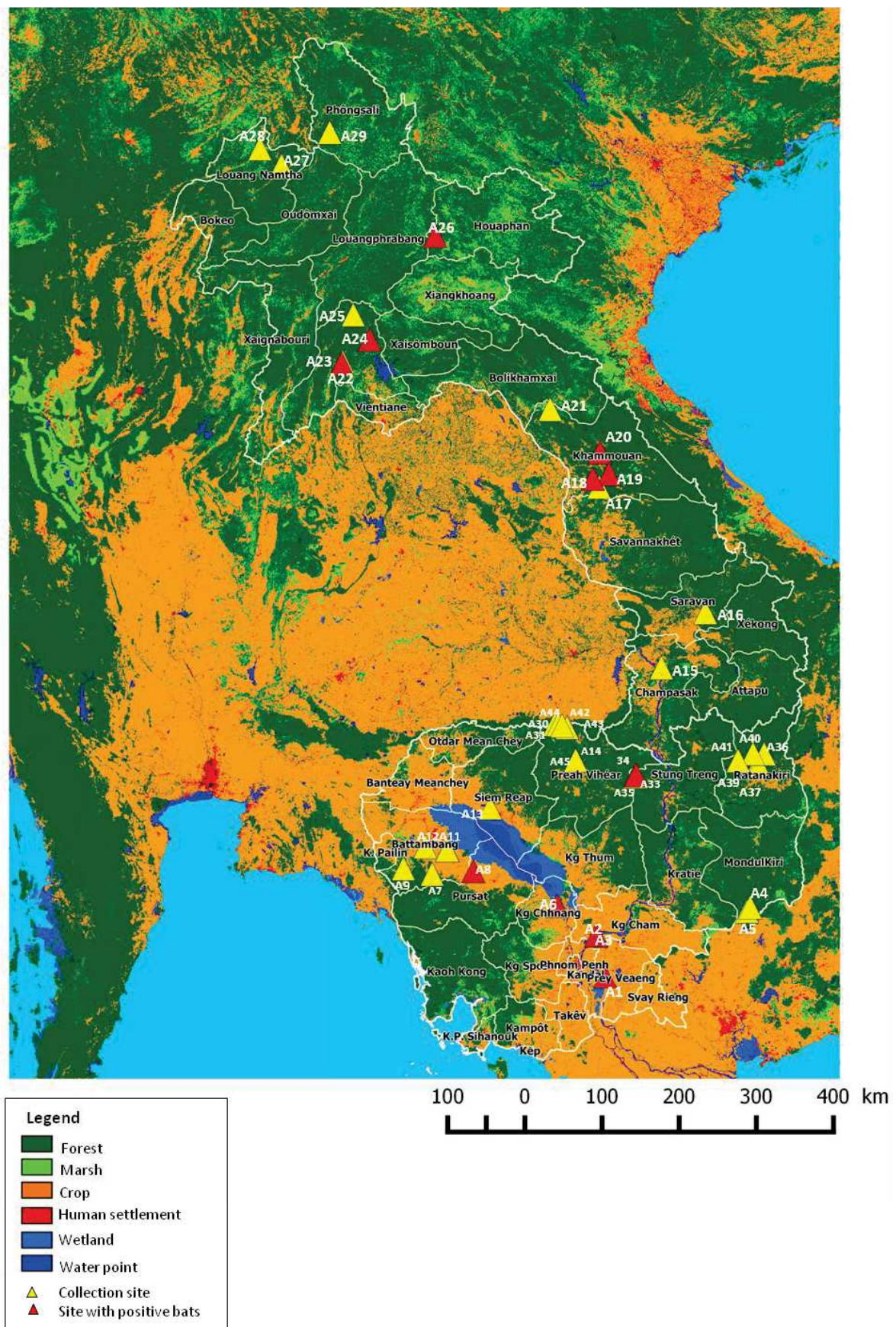
Supplementary Figure 1. Geographic distribution of the samples collected in Lao PDR and Cambodia. Sampling sites are shown by triangles and labeled from A1 to A45. Corresponding district and provinces are listed in the Supplementary Table 3. The sites where bats tested positive for astroviruses are shown by red triangles.

Supplementary Figure 2. Phylogenetic relationship of astroviruses constructed using a multiple alignment of 336 bp of the partial RdRp gene of astroviruses detected in this study and sequences from selected viruses of the genus Mamastrovirus. The tree was constructed using the Maximum-Likelihood method with the LG + G model. Bootstrap values were determined by 1,000 replicates. PoAstV: Porcine astrovirus (astV); BovAstV: Bovine astV; HAsV: Human astV; DromAstV: Dromadery astV; PcpAstV: Porcupine astV; VolAstV: Vole astV; AvAstV: Avian astV. For BatAstVs, the host genus is given.

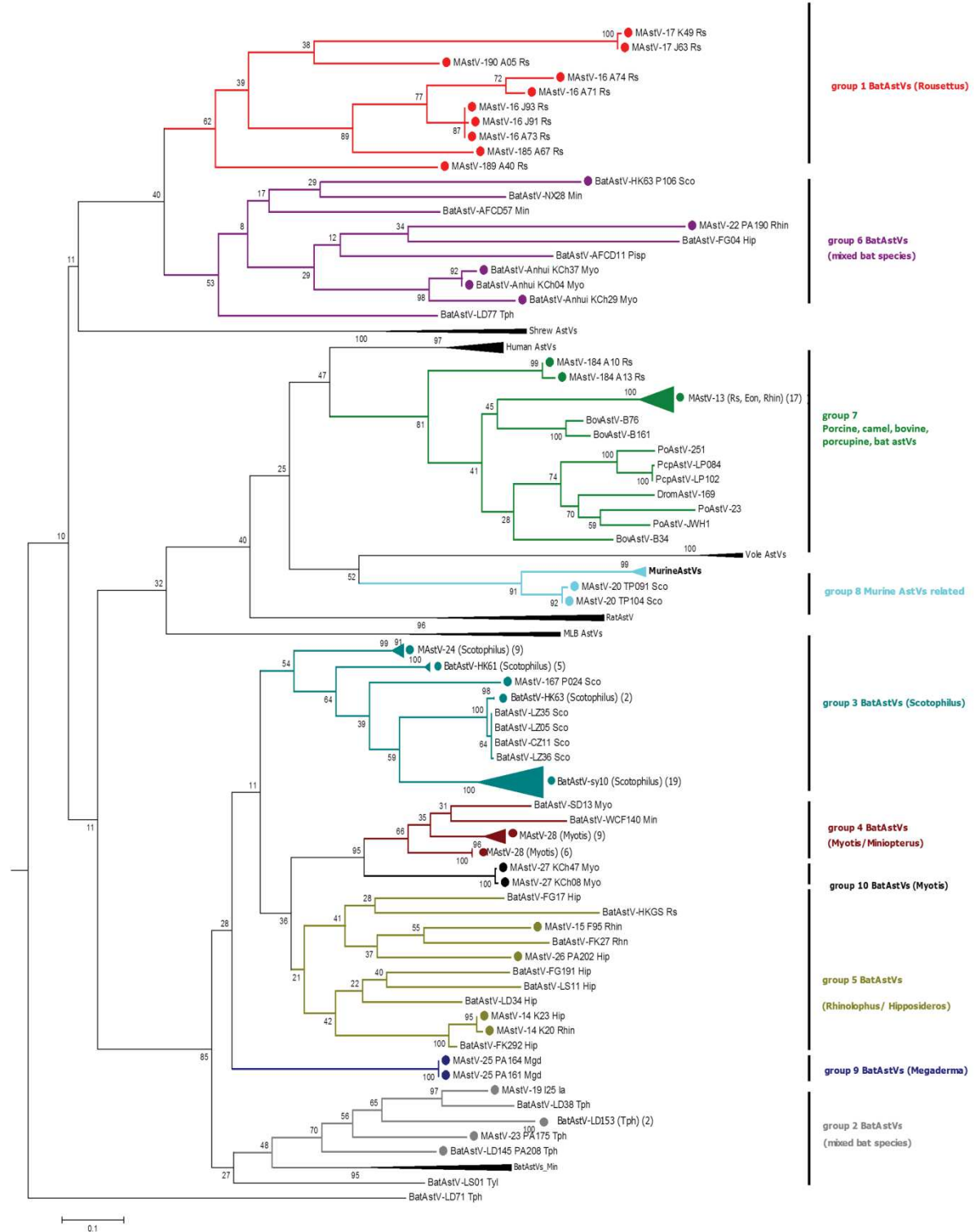
For every sequence detected, the strain, sample name and bat genus were included in the nomenclature. For clarity, strains named "PREDICT-MAstV-xx" are abbreviated as "MAstV-xx" in the tree. The genus of bat host is given as follows, Min: *Miniopterus*; Hip: *Hipposideros*; Tph: *Taphozous*; Pip: *Pipistrellus*; Tyl: *Tylonycteris*; Sco: *Scotophilus*; Rs: *Rousettus*; Myo: *Myotis*; Mgd: *Megaderma*; Eon: *Eonycteris*; Ia: *Ia*; Rhin: *Rhinolophus*. Accession numbers of the sequences are listed in the Supplementary Table 2.

Supplementary Figure 3. Schematic diagram of the partial genome organization of the novel bat astrovirus (BatAstV) PREDICT-MAstV-13_A91_Rs. The unsequenced 5' end region is shown as a dotted line. A total of 3123 nucleotides (nt) was obtained, covering partial the open reading frame ORF1b (699 nt) encoding the RNA dependent RNA polymerase, and the complete ORF2 region containing the gene coding for the capsid protein (2324 nt), an untranslated region (UTR) of 89 nt and a poly A tail on the 3' end. The start codon of the ORF2 is 8 nt downstream of the stop codon of ORF1b. Due to this overlap, translation of ORF2 occurs in a different frame than ORF1b.

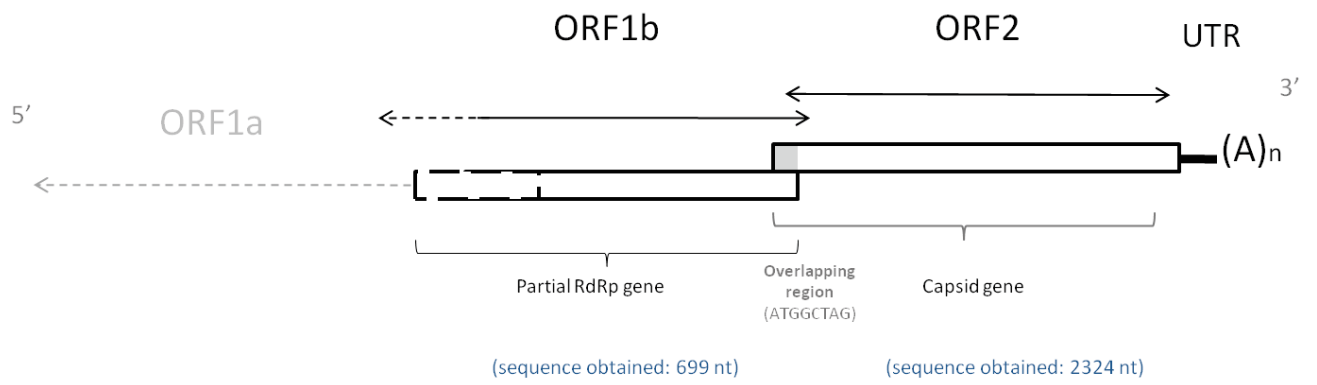
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Implications et perspectives

Notre étude confirme une nouvelle fois le potentiel de ces hôtes à transporter des virus, d'où la nécessité de surveiller ces animaux.

Notre travail a souligné que la spécificité d'hôte n'est pas stricte chez les astVs et que des transmissions peuvent aussi exister entre les hôtes mammifères. Un passage chez l'Homme n'est donc pas à exclure.

La plupart des séquences détectées semblent génétiquement liées à des astVs exclusivement chiroptères. Des séquences (groupe 7 et 8) semblent génétiquement plus proches de deux groupes d'astVs détectés préalablement chez des hôtes porcins, bovins, camélidés et murinés. Cependant, face au manque de solidité de l'arbre phylogénétique obtenu du fait de la saturation du génome, les résultats restent à prendre avec prudence.

En effet, les outils d'analyse phylogénétique sont principalement développés pour les organismes eucaryotes et basés sur le principe de non saturation des génomes. En théorie, les mutations sont des événements rares dans l'évolution : la probabilité qu'une substitution apparaisse et se fixe chez un individu est très faible. L'accumulation de mutations est corrélée avec le temps. C'est dans ce contexte que le polymorphisme des séquences découle de l'évolution et ainsi de la diversité des séquences.

Dans cette étude, les séquences d'astV présentent à la fois un degré de polymorphisme très élevé et une pression de sélection négative de la part de l'hôte. La saturation des séquences prouve que les distances observées entre les séquences ne reflètent pas l'évolution des souches d'astVs dans le temps. Ceci limite l'interprétation des résultats de l'analyse phylogénétique et rend le nombre et la diversité des souches détectées difficiles à déterminer.

La présence de clones peut s'expliquer par la co-circulation de plusieurs souches d'astV, ou de quasi-espèces chez un même hôte. A la vue du fort polymorphisme des séquences, la détection de clones pourrait également être le reflet d'une souche qui aurait rapidement évolué chez l'hôte, par un mécanisme d'hypermutation ou de recombinaison. En effet, la forte variabilité du génome également démontrée sur d'autres Mamastrovirus (Lukashov et Goudsmit, 2002; Van Hemert *et al.*, 2007), ainsi que des preuves de recombinaison entre les souches d'astV humaines ont déjà été mis en évidence (Walter *et al.*, 2001; Wolfaardt *et al.*, 2011).

Dans ce travail, l'ORF2 a pu être séquencé chez une seule souche d'astV. Cette séquence représente plusieurs perspectives d'étude : (i) les critères taxonomiques actuels de l'ICTV se basent sur l'analyse comparative de l'ORF2 pour définir de nouvelles espèces. (ii) L'ORF2 est aussi la partie du génome qui code les protéines composant la capside, qui interviendraient dans la liaison au récepteur cellulaire et l'entrée dans la cellule hôte. En outre, la configuration de la protéine de capside est déterminante pour définir le potentiel infectieux du virus.

La difficulté à effectuer un séquençage est probablement due (i) à la forte variabilité du génome, (ii) au manque de séquences de référence disponibles dans la littérature (en particulier chez les astVs chiroptères) et (iii) à la difficulté de préserver le virus dans les échantillons.

Dans ce travail, la difficulté à obtenir des séquences impliquées dans le caractère infectieux du virus, la faible longueur des fragments étudiés et le caractère conservé de la polymérase ne nous permet pas d'aller plus loin dans la caractérisation des astVs.

Différentes perspectives de séquençage ont été envisagées pour tenter de palier ces difficultés et aborder cet axe de recherche. Elles sont exposées dans la partie suivante.

Dans notre étude, les facteurs écologiques de l'évolution des astVs récemment développés par Mendenhall (2015) s'appliquent. Le développement de l'agriculture, de l'urbanisation et les pratiques humaines peuvent provoquer, voire exacerber, les contacts entre Hommes, chiroptères et autres mammifères. Ils peuvent intervenir dans le processus d'évolution des astVs et favoriser les mécanismes d'adaptation du virus responsables de la transmission inter-espèce (Mendenhall *et al.*, 2015).

Dans notre étude, l'environnement présumé des chiroptères et la nature des échantillons positifs soulignent comme pour les CoVs, la nécessité d'explorer la circulation de ces virus aux interfaces entre chiroptères, Hommes et mammifères domestiques. L'évolution rapide de l'environnement naturel au Cambodge et au Laos, par l'activité de l'Homme, soulignent également l'importance d'appréhender la structuration de l'environnement et d'identifier les zones de risques (partie 5).

Chapitre 4: La caractérisation moléculaire des astrovirus et coronavirus : les limites et perspectives

Contexte et objectif de l'étude

Les deux études précédentes ont mis en évidence la circulation de coronavirus et d'astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos. Ces virus ont été détectés chez des espèces chiroptères anthropophiles et/ou en contact régulier avec l'Homme. Les premières analyses phylogénétiques ont démontré que certaines souches semblent génétiquement apparentées à des souches où le passage de la barrière d'espèce a déjà été prouvé. Ces données soulignent la nécessité d'étudier le potentiel zoonotique et de transmission de ces virus.

Le but de cette partie du travail de recherche a été d'obtenir davantage de données génétiques sur les virus au niveau :

1) du gène de la RdRp : Les analyses de séquences développées dans les chapitres 2 et 3 ont été effectuées sur une portion du gène de la RdRp, et les données sont limitées par la taille et le caractère conservé des fragments utilisés. L'obtention de séquences plus longues (> 1000bp) au niveau de ce gène permettrait de (i) confirmer la position génétique définie par la première analyse sur les séquences courtes, (ii) se baser sur ces données génétiques pour le dessin d'amorces de séquençage d'autres régions du génome, comme le gène du spicule.

2) des gènes codant les protéines impliquées dans l'entrée des virus dans les cellules hôtes. L'objectif a été de séquencer le gène du spicule chez les CoVs et le gène de la capsid chez les astrovirus, dans le but d'étudier *in silico* les séquences nucléotidiques et les protéiques correspondantes pour caractériser les régions potentiellement impliquées dans l'entrée des virus dans la cellule cible et donc le potentiel de transmission des astVs.

Plusieurs étapes ont été mises en place dans ce travail de caractérisation:

- (i) des tentatives d'isolement sur cellules, dans le but de vérifier si les souches virales sont capables d'infecter et se multiplier dans d'autres cellules mammifères. Mais également dans le but d'isoler et amplifier les virus pour obtenir des quantités et qualités suffisantes de matériel génétique viral dans le but de séquencer le génome total ou partiel.
- (ii) des tentatives de séquençage, par le biais de plusieurs méthodes.

Ce travail n'a pas donné lieu à des résultats probants : le nombre de séquences obtenues a été très limité, et n'a pas réellement permis d'effectuer le travail de caractérisation au niveau des séquences protéiques, tel qu'il était envisagé. Cependant, la mise en place de nombreuses techniques de séquençage pour palier les problèmes et limites rencontrés au fur et à mesure des manipulations et des résultats provisoires, a fait partie intégrante de ma formation. Même si les résultats n'ont pas permis d'atteindre les objectifs initiaux, et de fournir assez d'éléments pour une publication, il semble intéressant de les exposer.

Ce chapitre sera donc présenté d'une manière différente : les stratégies mises en place ont été adaptées au fur et à mesure des résultats obtenus; leurs principes, leurs objectifs et les résultats obtenus seront exposés de manière chronologique. Dans un deuxième temps, une discussion et les perspectives qui peuvent ressortir de ce travail seront présentés.

Techniques mises en place

1. La culture cellulaire: un pré-requis au séquençage

L'objectif de l'amplification de virus sur culture cellulaire est de générer de plus grandes quantités de matériel génétique pour permettre la caractérisation moléculaire. Des tentatives d'isolement de virus à partir d'échantillons positifs en RT-PCR pour les astVs et CoVs ont été effectuées sur des cellules primaires de chiroptères, originaires d'Australie (cellules fournies par le CSIRO, 2012). Il s'agit de cellules de rein et d'embryon de *Pteroptus alecto* (PaKi et NBC respectivement) et des cellules de rein de *Miniopterus schreibersii* (MsKi) (table 9).

Le développement des compétences nécessaires en culture cellulaire, tels que l'entretien des lignées et l'inoculation sur cellules a fait partie du travail de première année de thèse. Les protocoles d'entretien sont exposés en [annexe 4](#).

Des tentatives d'isolement viral sur 3 lignées (PaKi, NBC et MsKi) ont été effectuées à partir d'inocula d'écouvillons rectaux testés positifs par diagnostic moléculaire (RT-PCR) pour la présence d'astV et de CoV. Cinq passages ont été effectués.

Résultats

L'entretien de ces cellules est apparu très délicat. Les cellules ont eu une croissance limitée et ont perdu leur adhérence au fur et à mesure des passages. Aucun effet cytopathique n'a été observé sur les cellules au cours de l'expérience. Après le premier passage, 16% à 20% des surnageants récoltés ont été testés positifs pour le virus par RT-PCR (faible amplification). Tous les surnageants récoltés à chaque passage suivant ont été testés négatifs par RT-PCR (table 9).

Tableau 9 : Résultats concernant l'isolement des astrovirus et des coronavirus sur des cellules primaires de chiroptères.

Cellules utilisées		Inoculation	
Nom	Description (espèce chiroptère)	Echantillon inoculé	Résultats
PaKi	Cellules rénales <i>Pteroptus alecto</i>	CoV : 11 écouvillons rectaux Astro : 9 écouvillons rectaux	-Pas d'ECP observé -P1: 20% des surnageants testés positifs en RT-PCR -P2 à P5: Surnageants testés négatifs en RT-PCR
MsKi	Cellules rénales <i>Miniopterus schreibersii</i>	CoV : 11 écouvillons rectaux Astro : 9 écouvillons rectaux	-Pas d'ECP observé -P1: 16% des surnageants testés positifs en RT-PCR -P2 à P5: Surnageants testés négatifs en RT-PCR
NBC	Cellules embryonnaires de <i>Pteroptus alecto</i>	CoV : 11 écouvillons rectaux Astro : 9 écouvillons rectaux	-Pas d'ECP observé -P1: 20% des surnageants testés positifs en RT-PCR -P2 à P5: Surnageants testés négatifs en RT-PCR

ECP=Effet cytopathique, P1: surnageant récolté lors du passage 1, P2: surnageant récolté lors du passage 2, etc.

Conclusion et discussion

L'isolement et l'amplification virale sur ces cellules ne semble pas être efficace. Les résultats positifs de RT-PCR sur les surnageants récoltés lors du premier passage semblent être attribués à la présence d'ARN viral des inocula. Au fur et à mesure des passages successifs, l'ARN viral présent dans l'écouvillon initial est dilué et devient non détectable en RT-PCR.

Ces résultats sont en concordance avec la littérature. Aucun CoV de chiroptère n'a jusqu'à présent pu être isolé sur cultures cellulaires continues de mammifères, ou sur cellules primaires de chiroptères (Gloza-Rausch *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2010; Drexler *et al.*, 2010). De même, si les astrovirus humains et de mammifères domestiques sont couramment isolés à partir de lignées cellulaires de mammifères, aucune étude n'a jusqu'à présent rapporté l'isolement avec succès d'astrovirus détectés par biologie moléculaire chez les chiroptères (De Benedictis *et al.*, 2011). Il est envisagé d'établir des lignées de cellules primaires à partir

d'espèces de chiroptères autochtones chez qui des virus d'intérêt ont déjà été détectés. Ceci permettrait d'effectuer de nouvelles tentatives d'isolement sur cellules, en s'affranchissant de la problématique du passage de la barrière d'espèce lors de l'inoculation sur les cellules. L'IPC a pu capturer un chiroptère (*Pteropus lylei*) au Cambodge. Des lignées de cellules primaires à partir de cette espèce autochtone sont en cours de développement (projet, entre l'IPC et un laboratoire allemand, de création de cultures de cellules primaires d'espèces chiroptères).

Dans le cas où les échantillons testés présenteraient des virus infectieux sur les cellules utilisées, plusieurs hypothèses pourraient expliquer les résultats négatifs obtenus:

(1) le virus est présent dans l'échantillon, mais l'entrée dans les cellules n'est pas efficace (récepteur cellulaire non adapté, ou aucune affinité entre les protéines virales de spicule et les récepteurs cellulaires).

(2) La présence d'ARN correspondant au virus, détectée par RT-PCR ne signifie pas que le virus est encore entier et infectieux dans l'échantillon inoculé. De plus, les échantillons initiaux ont été collectés essentiellement sur des animaux morts vendus sur les marchés, (contrainte imposée par le projet PREDICT). La qualité des échantillons et du matériel viral est donc très incertaine, et ne peut que décroître au fur et mesure des cycles de congélation-décongélation de l'échantillon.

Face aux résultats obtenus confortés par les données bibliographiques disponibles, et compte tenu de la difficulté de maintenir les cultures primaires et de la qualité incertaine des échantillons, il a été décidé de continuer les travaux de caractérisation moléculaire directement à partir des échantillons originaux les plus riches en virus.

2. Séquençage de régions stratégiques du génome

Chez les astrovirus, il est suggéré que la connaissance de la configuration des protéines de capside et la caractérisation de récepteurs cellulaires chez l'hôte potentiel, permettrait de mieux définir le tropisme cellulaire, l'entrée des astVs dans la cellule cible et donc le potentiel de transmission des astVs (Willcocks *et al.*, 1994; Jonassen *et al.*, 2001; Méndez *et al.*, 2012). Les connaissances restent très limitées puisqu'aucun récepteur impliqué dans l'entrée des cellules n'a été identifié jusqu'à présent (Dong *et al.*, 2011; DuBois *et al.*, 2013). Des données de séquence sur la capside pourraient apporter des informations sur d'éventuels éléments protéiques qui seraient impliqués dans l'entrée cellulaire (région codant pour un domaine de liaison à une protéine, domaines protéiques spécialisés dans la reconnaissance de polysaccharides, etc.) (figure 30).

Chez les coronavirus, la protéine de spicule est impliquée dans l'entrée des virus dans la cellule hôte (Gallagher et Buchmeier, 2001; Graham et Baric, 2010; Belouzard *et al.*, 2012). Les récepteurs impliqués dans l'entrée cellulaire des coronavirus humains et zoonotiques sont également bien identifiés et décrits (Chapitre 1, [Table 7](#)). Au niveau de la protéine de spicule, les régions déterminantes dans la liaison au récepteur de la cellule cible (RBD de la sous-unité S1), et dans le mécanisme de fusion des membranes (sous-unité S2), sont connues chez les CoVs pathogènes (figure 30). Il serait intéressant de les explorer chez les CoVs détectés dans ce travail, en particulier chez les souches de β CoVs et les souches apparentées aux PEDV-CoVs.

Plusieurs techniques de séquençage ont été envisagées pour obtenir ces séquences sur les souches d'intérêt: le séquençage Sanger et le séquençage à haut débit (HTS). Les différentes stratégies de séquençage Sanger sont exposées dans cette partie. Les stratégies mises en place par rapport au HTS seront développées dans la partie suivante.

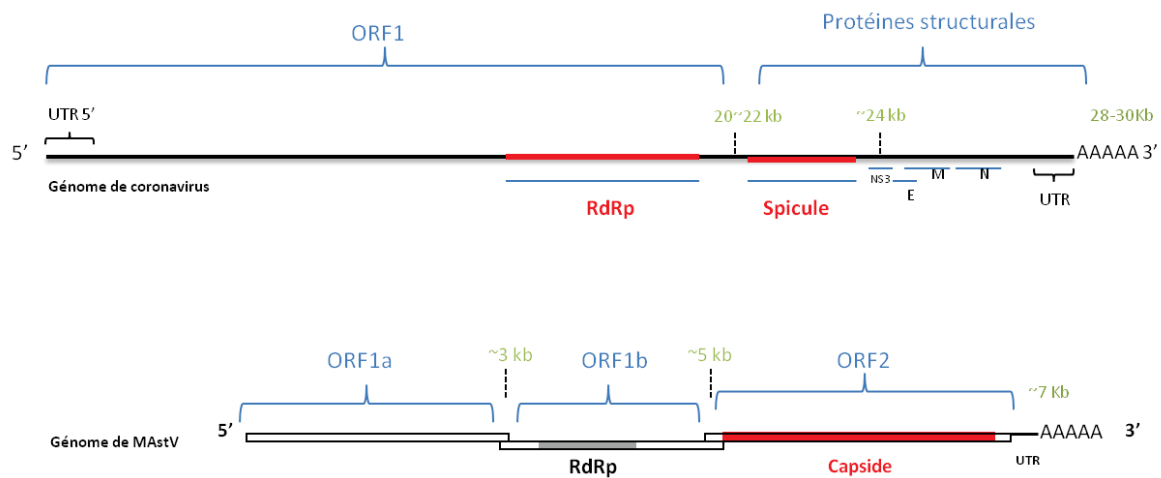


Figure 30 : Génomes des astrovirus et coronavirus et positions des gènes ciblés pour le séquençage et la caractérisation des virus (en rouge).

2.1. Le choix des souches d'intérêt pour le séquençage

Le choix des souches d'intérêt et des échantillons à prioriser pour le séquençage s'est fondé sur les premiers résultats d'analyses des séquences et leurs positions phylogénétiques par rapport aux souches connues. Les caractéristiques épidémiologiques associées à chaque échantillon, à savoir l'espèce hôte, l'environnement, et l'année de collecte, ont également été pris en compte. Cependant, le choix des échantillons s'est surtout basé sur des critères pratiques, tels que la qualité des résultats du premier diagnostic moléculaire, la quantité et qualité d'ARN disponible par échantillon (mesurées en spectrophotométrie) ainsi que la quantité d'échantillon original.

2.2. Le choix des amorces de séquençage : dégénérées, spécifiques, et oligo-d(T)

Les amorces spécifiques et dégénérées de séquençage ont été créées à partir des premiers résultats de l'alignement des séquences obtenues (chapitres 2 et 3) et des séquences de référence déjà existantes (GenBank).

- Les amorces dégénérées permettent de cibler un grand nombre de souches virales pour l'amplification de zones relativement conservées. Cependant, la sensibilité est assez faible et ne permet pas d'amplifier une région cible du virus dans des échantillons présentant une quantité de matériel génétique limitée.
- Les amorces spécifiques permettent d'initier la réaction de transcription inverse (RT) ou d'amplification par PCR sur une région caractéristique des souches d'intérêt. Ceci augmente la sensibilité de la réaction, au détriment de la spécificité qui est propre à chaque souche. Il faut donc créer des amorces spécifiques pour chaque souche virale ciblée.
- Les amorces oligo-d(T) s'hybrident avec les queues poly(A) des génomes viraux. Chez les astrovirus, la partie terminale 3' du génome est difficile à exploiter (ORF2) : elle présente peu de zones conservées et peu de séquences de référence sont caractérisées. La présence d'une queue poly(A) à l'extrémité 3' représente donc une cible idéale pour initier la RT en amont du génome, sans avoir besoin de connaître la séquence spécifique.
- Les amorces flanquées par une séquence "linker" sont des amorces spécifiques qui possèdent à leur extrémité 5', une séquence additionnelle, connue et différente des régions ciblées (voir figures 36 et 37). Le fragment amplifié à l'issue d'une première PCR sera donc flanqué par ces deux séquences courtes, ici : "T7". Une PCR nichée utilise des amorces spécifiques aux linkers T7 pour amplifier le fragment issu de la première PCR.

2.3. Séquençage du gène de la polymérase

L'amplification d'un fragment long de la RdRp est réalisée en deux temps. Une PCR long fragment utilisant des amorces spécifiques permet d'obtenir un amplicon de 3000 bp au niveau du gène de la RdRp. A partir de ce long fragment, des PCRs nichées utilisant des amorces spécifiques intermédiaires amplifient des séquences plus courtes (800 bp) qui se chevauchent (figure 31). Ces amplicons d'une taille maximale de 800 bp peuvent être séquencés par simple séquençage Sanger. Les PCRs nichées permettent de travailler à partir du premier produit de PCR et non à partir de l'ARN initial, qui est en quantité limitée.

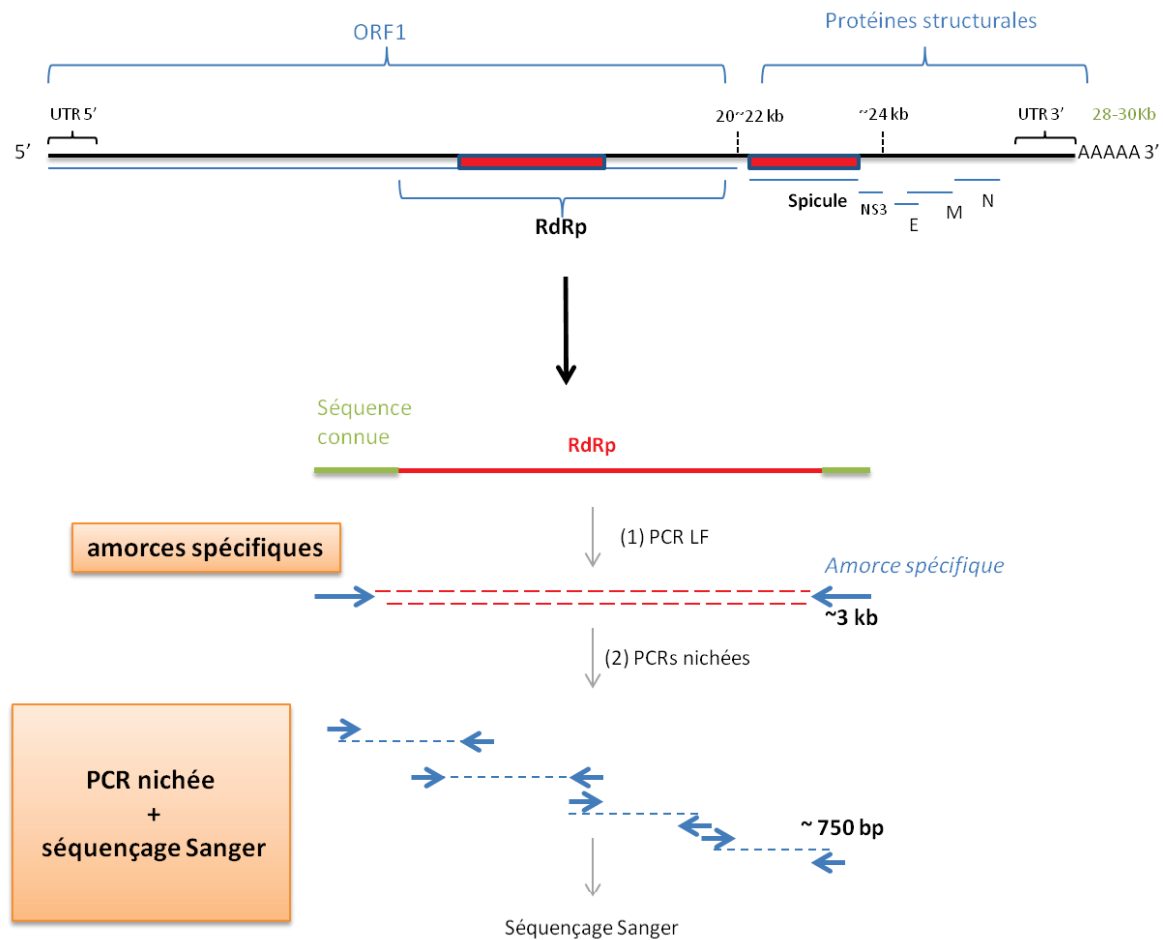


Figure 31 : Stratégie de séquençage d'une région du gène de la RdRp chez les coronavirus par RT-PCR nichée. Une PCR long Fragment (LF) permet d'obtenir un amplicon d'environ 3kb (1). Il est ensuite utilisé comme matrice pour amplifier des fragments plus courts se chevauchant (2). Les amorces spécifiques sont synthétisées grâce à l'alignement de séquences connues en amont (séquences

obtenues dans le chapitre 2, Watanabe *et al.*, 2010), et de séquences de référence disponibles sur la GenBank en aval.

Le séquençage de la RdRp chez les astVs n'a pas été plus loin que ce qui a été effectué lors du travail présenté chapitre 3. Les séquences plus longues de RdRp (> 600bp), n'apportaient pas d'informations pertinentes pour la phylogénie, à la vue du polymorphisme élevé des séquences (il semble y avoir autant de séquences que de séquençage Sanger effectué). Cette partie ne sera pas développée.

2.4. Séquençage des gènes codant les protéines impliquées dans l'entrée cellulaire

2.4.a. Séquençage du spicule chez les coronavirus

Chez les CoVs, des zones conservées situées en amont et en aval du spicule ont été utilisées pour le dessin d'amorces spécifiques. Une PCR long fragment utilisant ces amorces permet d'obtenir un fragment qui encadre la séquence de spicule (figure 32). A partir de ce long fragment, deux stratégies sont envisagées : (i) des PCRs nichées utilisant des amorces consensus permettent d'amplifier des séquences plus courtes (800 bp) qui se chevauchent, de la même manière que pour le séquençage de la RdRp (figure 32). Cependant, la PCR nichée nécessite de synthétiser des amorces spécifiques, donc de connaître des régions intermédiaires d'amorçage sur le fragment. (ii) Dans le cas contraire, ou si l'étape de PCR nichée ne fonctionne pas, la technique de walking primer à partir de l'amplicon long fragment est envisagée (figure 32). Elle est sous-traitée par une entreprise de séquençage (Macrogen).

2.4.b. Séquençage du gène de la capside chez les astVs

La RT spécifique utilisant des amorces oligo-d(T), initie la synthèse d'ADNc à partir de l'extrémité 3' du génome (figure 33). L'amplification de l'ORF2 est effectuée par PCR nichée long fragment, en utilisant des amorces spécifiques dessinées sur la base des séquences de RdRp obtenues à la fin de l'ORF1b (chapitre 3) et des séquences de référence existantes. Le long fragment amplifié est séquencé par walking primer. En effet, il n'a pas été possible de dessiner des amorces spécifiques intermédiaires comme pour les CoVs, pour amplifier et des fragments plus courts se chevauchant (manque de séquences de référence du gène de la capside et forte variabilité de la région).

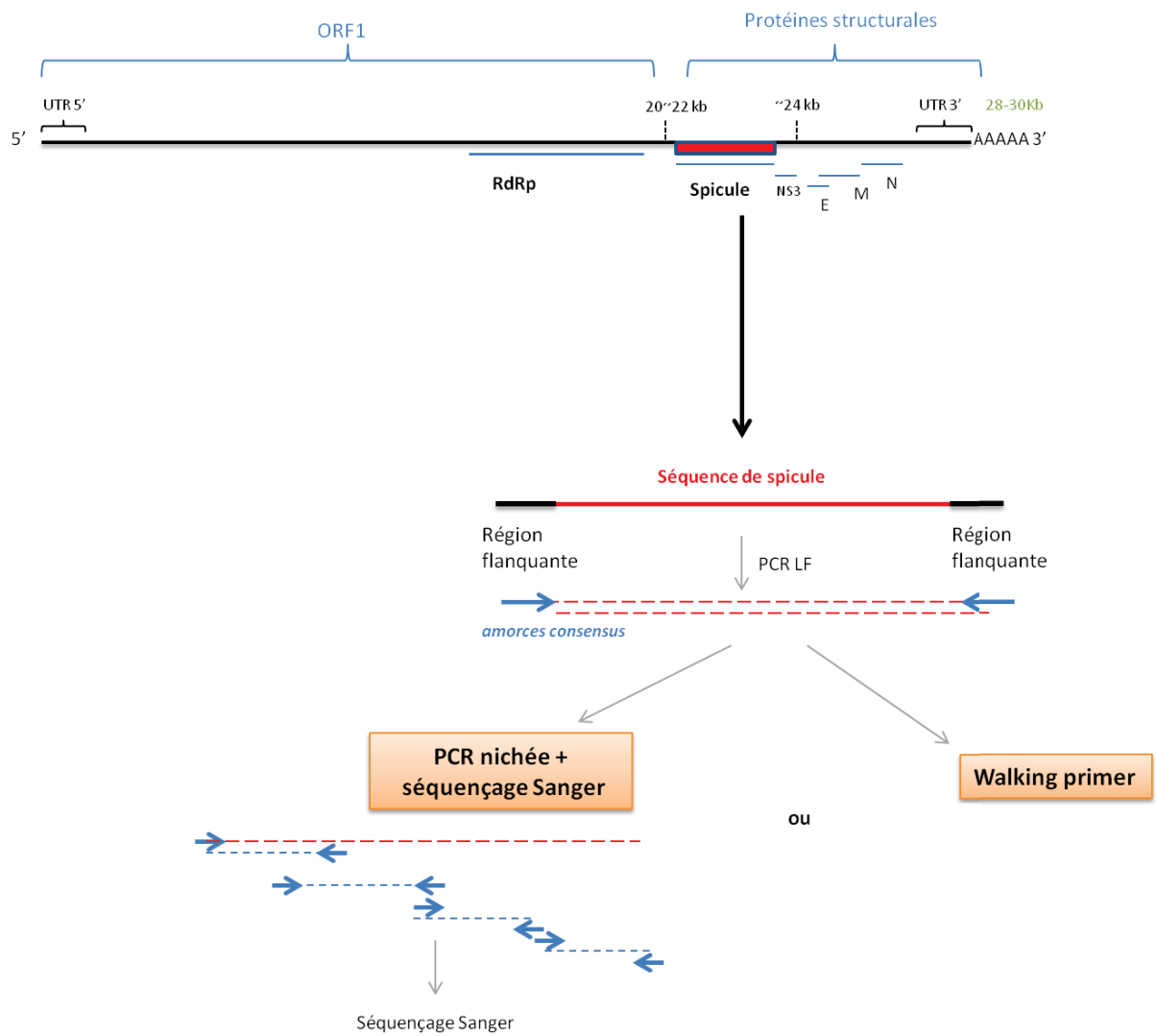


Figure 32 : Stratégie de séquençage d'une région du gène du spicule chez les coronavirus par RT-PCR nichée.

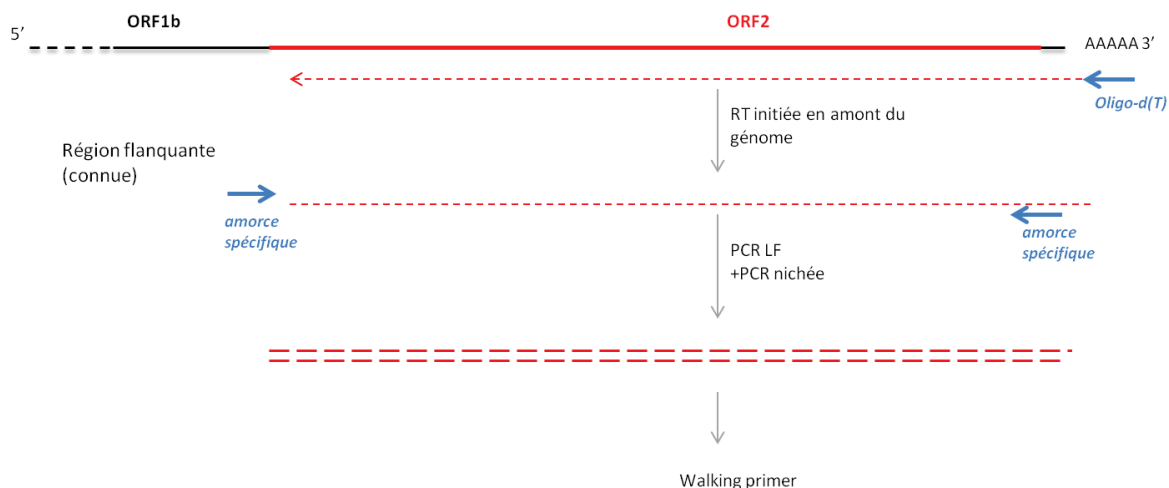


Figure 33 : Stratégie de séquençage d'une région du gène de la capside chez les astrovirus.

2.5. Résultats et discussion

Chez les CoVs, des séquences d'environ 1500 bp sur la RdRp ont été obtenues pour 43 échantillons, appartenant à 3 groupes (β CoV-sous-groupe D, α CoV-1, α CoV-2). L'analyse les séquences a confirmé leur position phylogénétique par rapport aux travaux établis dans le chapitre 2 (figure 34). Les 23 séquences appartenant au sous-groupe D des β CoVs se regroupent dans 4 clusters similaires à ceux obtenus avec les séquences plus courtes. La séquence de l'échantillon PEDV présente 97% et 99,6% de similarité en acides nucléiques et acides aminés respectivement avec les souches de PEDV. Ces résultats nous permettent de valider l'utilisation des séquences de références connues appartenant à ces groupes pour le séquençage du gène du spicule.

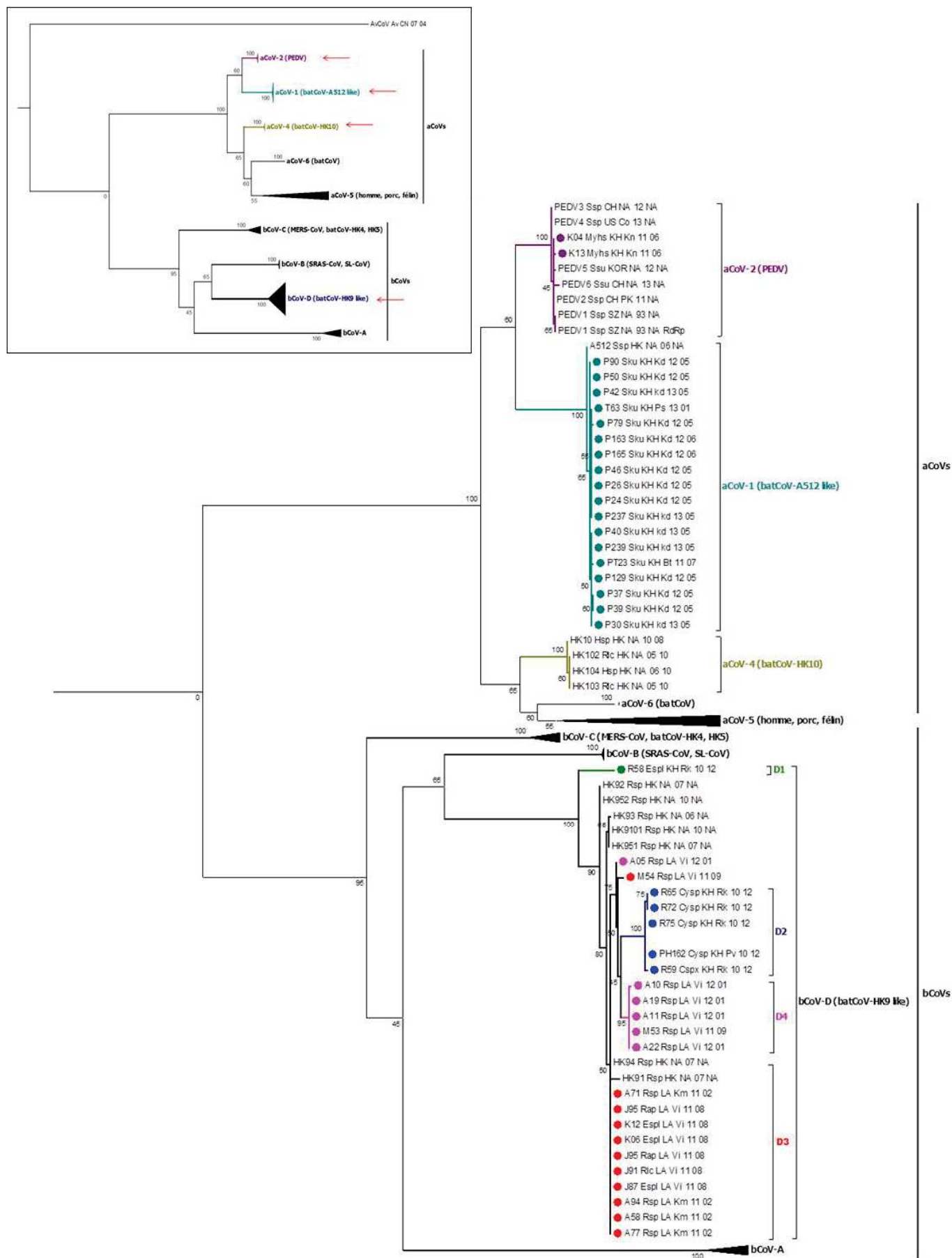


Figure 34 : Arbre phylogénétique basé sur l'alignement de séquences de la RdRp chez les CoVs (461 acides aminés). L'arbre a été obtenu en utilisant une méthode du maximum de vraisemblance (100 répétitions). Les séquences obtenues à l'IPC sont annotées d'une puce. Les couleurs des groupes correspondent à celles utilisées lors de l'analyse dans le chapitre 2.

Grâce aux techniques de séquençage Sanger, les séquences complètes et partielles de spicule ont été obtenues pour quelques CoVs des groupes α CoV-1 (n=7) et α CoV-2 (n=1) respectivement. Aucune séquence du gène du spicule n'a été obtenue pour des β CoVs.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce manque de réussite, à commencer par la qualité incertaine du matériel génétique viral. Il se peut que le génome soit endommagé, notamment au niveau des extrémités du génome, dont la région ciblée en 3'. De plus, les amorces de séquençage ciblent une région peu conservée du génome et moins documentée chez ces souches de CoVs. Il est possible qu'elles ne permettent pas l'amplification de cette région. Il est également possible que des recombinaisons aient pu intervenir dans l'histoire évolutive de ces souches, expliquant que les séquences des souches de référence ne permettent pas de définir des amorces plus spécifiques. En effet, les recombinaisons sont des événements fréquents chez les CoVs et qui peuvent jouer un rôle crucial dans le passage de la barrière d'espèce hôte et le tropisme cellulaire (Becker *et al.*, 2008; de Haan *et al.*, 2008; Graham et Baric, 2010). Zhang *et al.* (2004) mettent évidence chez le SRAS-CoV, 7 régions de recombinaisons potentielles au niveau des gènes de la RdRp et du spicule, avec 6 autres souches de CoVs porcins (PEDV, TGEV), bovin (BCoV), humain (hCoV-229E), murin (MHV) et aviaire (IBV) (Zhang *et al.*, 2004). Cependant, cette hypothèse est difficile à mettre en évidence dans notre cas, en l'absence de séquences supplémentaires sur les CoVs étudiés. D'autres stratégies de séquençage ont été suggérées pour tenter d'obtenir des séquences de spicule supplémentaires et pouvoir faire une étude complète comparative au niveau de cette région (cf. partie suivante).

Chez les astVs, le séquençage de la capside a été efficace pour une seule souche seulement : les résultats ont été intégrés dans le chapitre 3. Ceci a permis de définir une nouvelle espèce d'astrovirus sur la base des critères actuels de l'ICTV (Bosch *et al.*, 2010a).

Hormis des problèmes dus à la qualité des échantillons, les difficultés de séquençage peuvent trouver leur origine dans la nature très variable de cette région, exacerbée par le fort degré de saturation du génome, mis en évidence dans le chapitre 3. De plus, trop peu de séquences de référence existent au niveau de l'ORF2, pour permettre le dessin d'amorces spécifiques. Cette hypothèse semble valable, puisque le seul échantillon pour lequel le séquençage a été efficace, appartenait au groupe 7 dans l'arbre défini au chapitre 3, qui incluait des souches déjà caractérisées d'astVs porcins, bovins, de camélidés et porc-épic. Elles ont alors pu servir à la création d'amorces spécifiques.

En conclusion de ce travail de séquençage chez les astVs et CoVs, outre la variabilité de la région des gènes de capsid et spicule respectivement, et le manque de spécificité des amorces, il semble que l'écueil principal au séquençage soit la sensibilité de détection. En effet, la quantité et la qualité de matériel viral sont primordiales pour effectuer un bon séquençage. La RT spécifique permet de cibler le génome viral. Cependant, la transcriptase inverse n'a pas la capacité d'amplifier le génome dans les premières phases de manipulation de l'échantillon. Elle n'a pas non plus la capacité de réparer l'ARN si le génome viral est dégradé. Il semble que la qualité initiale de l'échantillon est primordiale pour faciliter le séquençage Sanger.

L'objectif du travail suivant a été d'améliorer ces points par l'utilisation du séquençage à haut débit (HTS), dont la sensibilité de détection est bien plus efficace que le séquençage Sanger (Cheval *et al.*, 2011; Paparini *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016).

3. Le séquençage à haut débit

Principes et objectifs

L'IPC dispose d'un séquenceur à haut débit Roche 454. En début de ce travail de thèse, il était suggéré d'effectuer du séquençage à haut débit (HTS) à partir du matériel génétique viral amplifié grâce aux travaux d'isolement du virus sur cellules. Les résultats n'étant pas probants, les premiers essais de HTS ont été effectués à partir des échantillons bruts. La procédure a rapidement avorté à cause de quantité et qualité trop faibles de matériel génétique viral dans les échantillons. Les étapes de contrôle qualité des échantillons lors de la préparation de l'échantillon pour le HTS, n'ont pas été franchies. L'extraction d'ARN ne fait pas la distinction entre les acides nucléiques viraux et les acides nucléiques de l'hôte : le matériel génétique viral est "noyé" dans le matériel génétique total de l'échantillon. Si l'échantillon a une faible charge virale, le séquençage en HTS va générer plus de séquences appartenant à l'hôte que de séquences virales d'intérêt, et les données brutes de séquençage sont difficilement exploitables.

Pour palier cette difficulté, deux techniques d'enrichissement des échantillons et de purification du génome viral ont été envisagées (figure 35). Elles se basent sur une première étape de RT spécifique du génome viral et une deuxième étape de purification et d'amplification par PCR grâce à des amorces flanquées par une séquence "linker" (figures 36 et 37). Cette stratégie a nécessité de dessiner des amorces spécifiques aux souches virales d'intérêt. Ceci a été possible grâce aux données générées par le travail précédent de séquençage Sanger. Par soucis de temps et de budget, il a été décidé d'effectuer ces manipulations sur les coronavirus seulement (n=3 échantillons), puisque (i) le séquençage Sanger a donné les meilleurs résultats sur ces virus et (ii) chez les astrovirus, le

polymorphisme des séquences et le manque de données sont des conditions limitantes pour la mise en place de cette stratégie. Les deux techniques sont :

- (i) la synthèse d'ADNc spécifique double brin (ADNc db) en utilisant la réaction de Klenow et des amorces spécifiques, au niveau de l'extrémité 3' du génome (figure 36),
- (ii) la purification d'ADNc spécifique marqué à la biotine, par le biais de billes magnétiques recouvertes de streptavidine (figures 37 et 38).

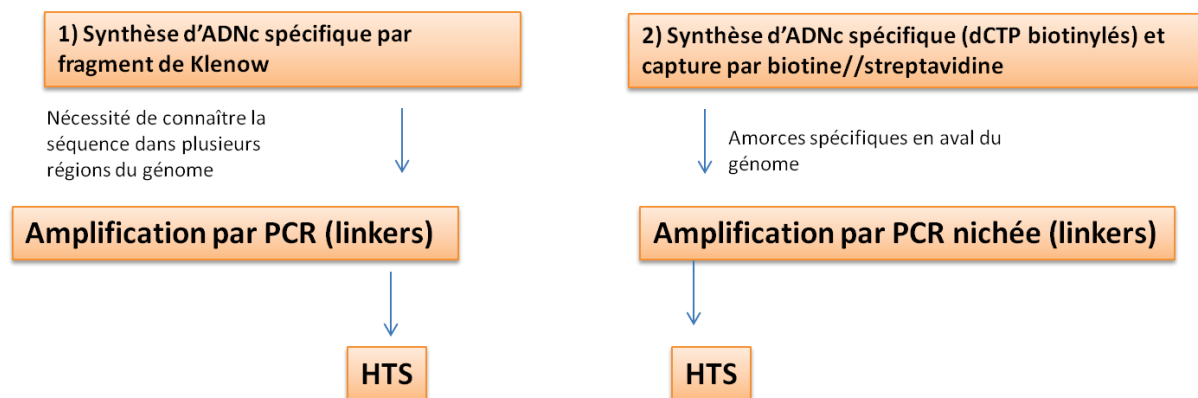
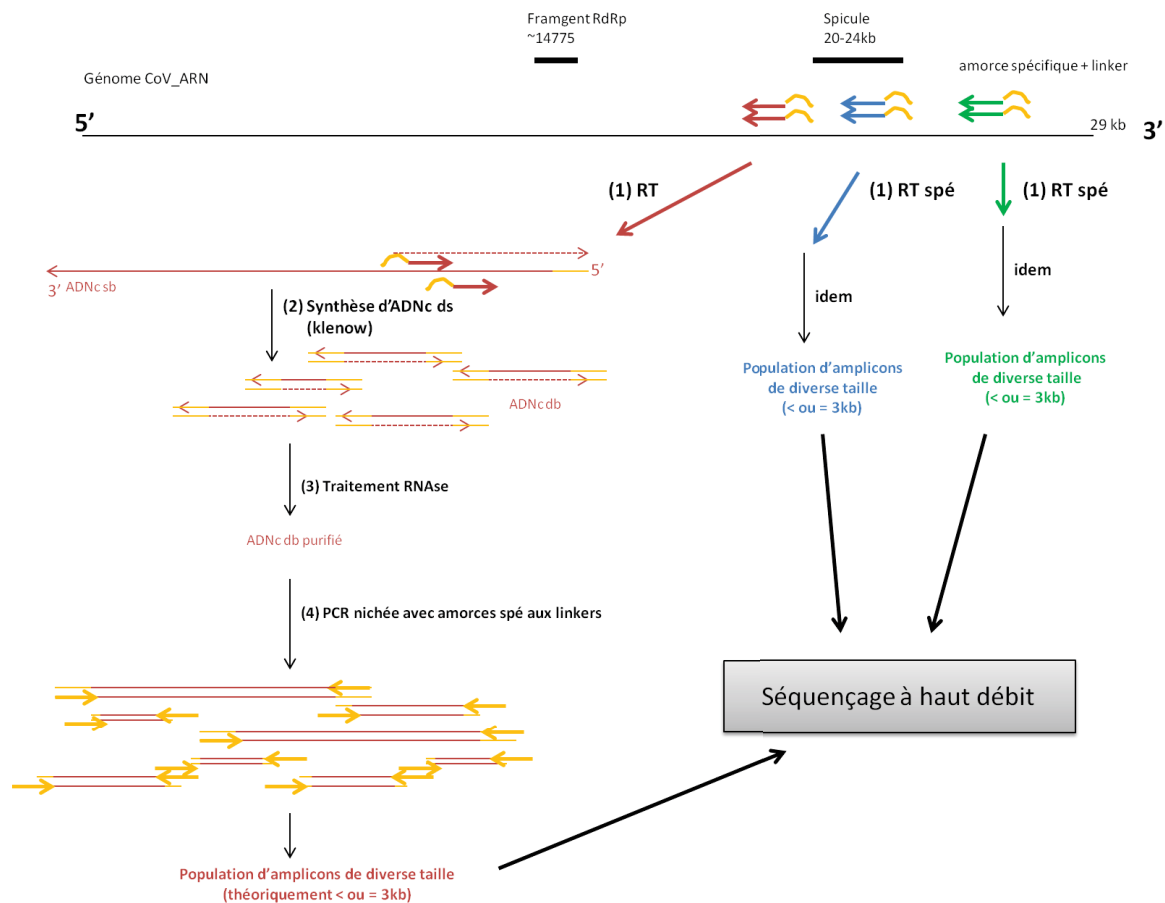


Figure 35 : Résumé des techniques appliquées dans la préparation au séquençage à haut débit (HTS) des coronavirus.

Face au manque de temps imparti pour ces travaux, en cas de réussite de cette étape de préparation, l'étape de HTS serait sous-traitée à une compagnie privée de séquençage (MacroGen, Corée) .



(1) Transcription inverse (R) spécifique à l'aide d'amorces spécifiques flanquées par des séquences "linker"

(2) Synthèse de l'ADNc double brin grâce au fragment de klenow

(3) Purification des ADNc db par la RNase

(4) PCR nichée utilisant des amorces ciblant les séquences "linkers"

Figure 36 : Technique d'enrichissement viral par l'utilisation d'amorces spécifiques flanquées et du fragment de klenow. La première étape est la synthèse d'ADN complémentaire spécifique double brin (ADNc db) en utilisant le fragment de Klenow et des amorces spécifiques du génome (1,2). Ces amorces sont flanquées au niveau de l'extrémité 5', par une séquence "linker" T7 connue. Les fragments d'ADNc db obtenus sont purifiés par l'action d'une enzyme RNase qui va éliminer les ARNs dans l'échantillon (3). Une étape d'amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques aux séquences "linker" amplifie les fragments d'ADNc flanqués (4). La population d'amplicons obtenue se compose de fragments de taille diverse, inférieur à 3kb.

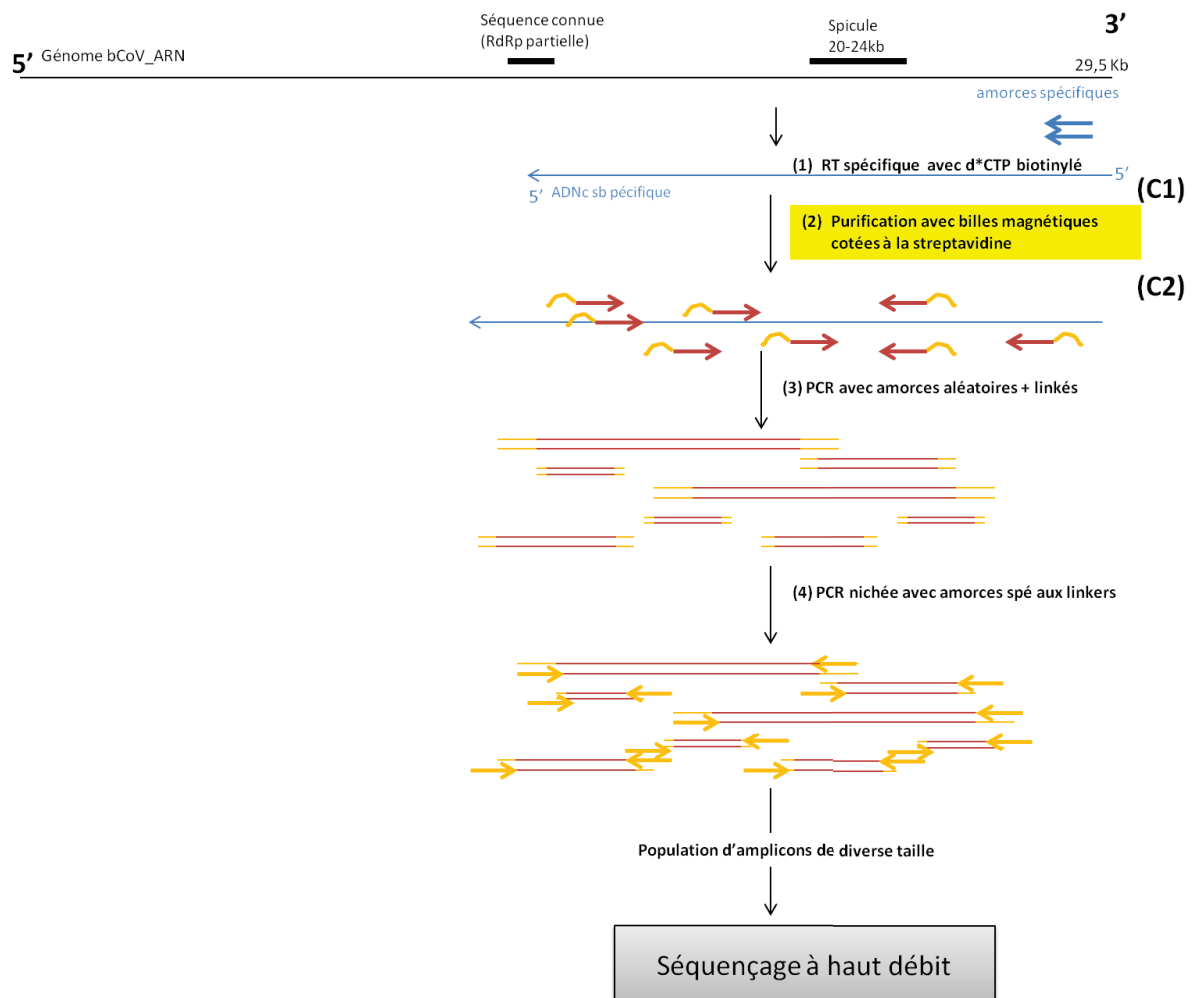


Figure 37 : Technique d'enrichissement viral par l'utilisation du complexe de purification biotine/streptavidine. La première étape est la synthèse d'ADN complémentaire spécifique simple brin (ADNc sb) grâce à des amorces spécifiques ciblant la région en amont du génome (1). (Les amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide de l'alignement des séquences obtenues par séquençage Sanger, et des séquences de référence disponibles dans la GenBank). Le brin d'ADNc est marqué à l'aide de dCTP biotinyllés, utilisés dans la réaction de transcription inverse (RT). L'ADNc biotinyllé est purifié grâce à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine, protéine qui a une affinité très forte pour la biotine (2). La technique de purification par le complexe biotine/streptavidine est schématisée figure 39. L'ADNc spécifique ainsi purifié va être amplifié par PCR nichée utilisant des amorces aléatoires flanquées par des séquences "linker" en 1er round (3), et des amorces ciblant les séquences "linker" en 2nd round (4). La population d'amplicons obtenue se compose de fragments de taille diverse qui peuvent être utilisés pour le séquençage. Les étapes (C1) et (C2) sont des PCRs de détection usuelles (Chapitre 2, Watanabe *et al.*, 2010) utilisées comme contrôle de la présence d'ADNc viral.

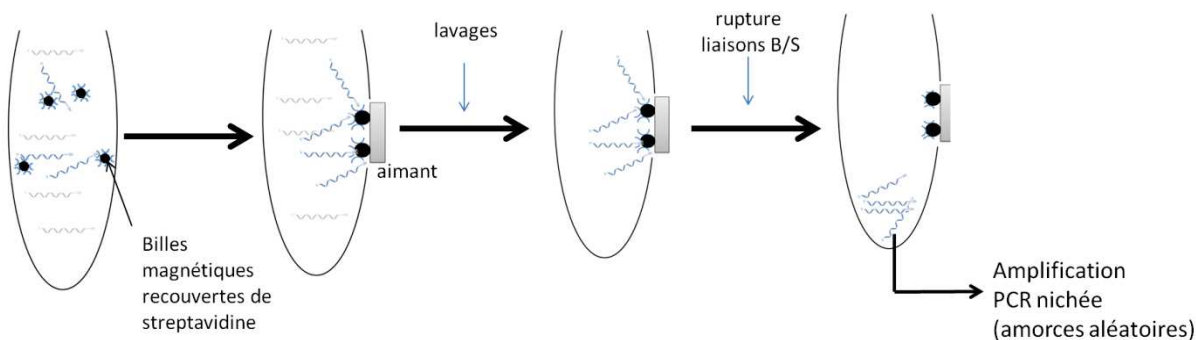


Figure 38 : Principe de la purification par le complexe biotine/streptavidine (B/S). Les molécules d'acides nucléiques marquées sont en bleu. Elles se lient aux streptavidines (S) qui recouvrent des billes magnétiques. L'application d'un aimant à la surface du tube attire les billes magnétiques liées aux molécules marquées via la liaison (B/S). Les molécules d'acides nucléiques indésirables (non marquées) sont nettoyées par lavages successifs. L'ADNc marqué est ensuite détaché des billes par un détergent qui rompt les liaisons (B/S). L'échantillon purifié ne contient que l'ADNc d'intérêt.

Résultats et discussion

La stratégie de synthèse d'ADNc db avec le fragment de klenow n'a pas donné de résultat positif (aucune amplification visible en électrophorèse, résultats non montrés). De plus, la capacité de synthèse du fragment de klenow est limitée : l'enzyme peut synthétiser des fragments jusqu'à 4 kb. Il faut donc établir des amorces spécifiques tous les 3 à 3,5 kb pour espérer une RT optimale. Pour couvrir le génome, la technique nécessite de connaître au moins 10 régions d'amorçage, puisque le génome des CoVs est d'environ 30 kb. Notre but était de privilégier la région autour du gène du spicule (~5 kb). Néanmoins, malgré les efforts pour se concentrer sur cette région, la stratégie n'a pas été efficace.

Les tentatives d'enrichissement ont été peu fructueuses. Après la RT spécifique incorporant des bases biotinylées, la PCR de détection usuelle (C1) a donné des résultats positifs (table 10). L'introduction de dCTP dans le processus de RT ne semble pas modifier les conditions de PCR par la suite.

Cependant, lorsque l'étape de purification B/S est rajoutée, la PCR de détection usuelle (C2) donne des résultats négatifs ou d'amplification très faible, selon les échantillons (table 10). L'étape de purification semble engendrer une perte assez importante de l'ADNc viral.

La perte d'ARN viral semble être un facteur limitant aux étapes 3 et 4 de la stratégie d'enrichissement (figure 38). En effet, ces étapes 3 et 4, peu d'amplification est observée après l'électrophorèse. Il se pourrait que la présence de dCTP biotinylés perturbe l'étape de polymérisation 3 et 4, qui requiert une enzyme spécifique (long fragment).

Tableau 10 : Résultats de la stratégie d'enrichissement du génome viral par la technique (ii)

Nom échantillon	(1) RT (dCTP biotinylés)	(C1) Test PCR de détection *	(2) Purification (B/S)	(C2) Test PCR de détection *	(3, 4) Amplification par PCR nichée avec amorces aléatoires
A12	✓	oui	Pas de purification	oui	faible
M53	✓	oui	Pas de purification	oui	non
RK58	✓	oui	Pas de purification	oui	Très faible
A12	✓	oui	✓	Bande très faible	non
M53	✓	oui	✓	non	non
RK58	✓	oui	✓	non	non

*protocole utilisé pour la détection des coronavirus (Watanabe *et al.*, 2010), pour les PCRs de contrôle C1 et C2. La PCR amplifie un fragment du gène de la RdRp (343 bp).

✓ : étape effectuée.

Pour exclure toute suspicion sur la différence de capacité de polymérisation de l'enzyme utilisée pour l'amplification (Taq polymérase), les étapes C2 (table 10), 3 et 4 ont été testées avec la même enzyme. Les résultats n'ont pas été affectés.

L'étape de purification semble être un facteur limitant de cette stratégie d'enrichissement. L'hypothèse envisagée serait un problème de capacité de purification du système B/S. En effet, le fournisseur ne précise pas la longueur maximale des brins d'ADN qui peuvent être purifiés par ce système. La capacité de la synthèse d'ADNc de la

transcriptase inverse est de 12 kb (dans les conditions optimales). Il se peut que la longueur de l'ADNc soit un facteur limitant pour la liaison des brins d'acides nucléiques, par exemple, par encombrement des sites de liaison à la streptavidine, ou par fragilité des brins d'ADNc lors des divers lavages.

Il est difficile d'expliquer les raisons précises de ces mauvais résultats. Le manque d'efficacité des amorces dessinées (trop faible spécificité et/ou sensibilité des amorces). Un deuxième élément limitant qui semble être très important est la qualité de l'échantillon initial. Le risque est d'avoir, lors du traitement des données brutes de HTS, d'énormes difficultés pour trier les séquences du virus, "noyées" parmi les trop nombreuses séquences non virales obtenues. Il est donc impératif de passer par des étapes de purification, même si elles engendrent des pertes de matériel génétique. Dans notre cas, la perte a été trop importante pour continuer les manipulations. Elles doivent néanmoins être privilégiées.

La connaissance de la charge virale permettrait de mieux choisir les échantillons qui présenteraient un potentiel d'amplification plus élevé. Il serait intéressant de passer par cette étape pour détecter les échantillons les plus adéquats pour tenter la purification puis le séquençage à haut débit. Actuellement, il n'y a pas de PCR quantitative efficace sur les astVs de chiroptères. Pour les CoVs, une PCR quantitative a été mise au point (Watanabe *et al.*, 2010), mais utilise des amorces spécifiques aux β CoV-D uniquement. Le matériel viral étant limité, nous n'avons pas mis au point cette technique, mais elle reste à envisager dans les étapes préliminaires du HTS.

Conclusion et perspectives

Ce travail a mis en lumière les écueils rencontrés dans la caractérisation moléculaire des astrovirus et des coronavirus, dans l'isolement et l'amplification des virus et dans les méthodes de séquençage Sanger ou par HTS. Ces problématiques soulèvent l'importance des étapes de préparation de l'échantillon, depuis sa collecte jusqu'au séquençage.

Dans le cadre du projet PREDICT, la directive était de prélever les chiroptères aux interfaces avec l'Homme, sans qu'aucun animal ne soit tué. Les objectifs étaient donc différents, et les conditions non optimales pour un projet de caractérisation moléculaire. Sur le terrain, effectuer des prélèvements sur des animaux fraîchement tués permettrait de s'assurer de la qualité des échantillons en vue d'une potentielle caractérisation moléculaire. Cependant, les chiroptères étant protégés par la loi, il est difficile d'obtenir les autorisations pour capturer et euthanasier ces animaux. De manière générale, dans un projet de caractérisation des génomes viraux à partir de prélèvements animaux, l'étape de collecte ne doit pas être négligée, et implique d'obtenir les autorisations nécessaires pour effectuer des prélèvements de qualité si les animaux sont protégés.

La qualité et la quantité du matériel génétique viral sont également très importantes. Elles ne peuvent que baisser au fur et à mesure des cycles de congélation-décongélation. Dans le cadre des astVs, de nombreux échantillons n'ont plus passé le seuil de détection en RT-PCR, après une nouvelle extraction d'ARN, et étaient donc inexploitable (chapitre 3). Ceci soulève la nécessité d'effectuer plusieurs aliquots d'un échantillon positif d'intérêt, d'éviter au maximum les variations de température, et de maîtriser les étapes suivantes de caractérisation moléculaire.

L'isolement des virus détectés chez les chiroptères, en culture cellulaire est une étape non maîtrisée. L'infection expérimentale directement sur l'hôte chiroptère semble être la technique la plus judicieuse pour amplifier les virus. Ces stratégies sont rarement documentées dans le cadre des infections à CoVs et astVs (Watanabe *et al.*, 2010). Et pour cause, les expérimentations sur les chiroptères sont très difficiles : elles requièrent des équipements et infrastructures adaptés au maintien des chiroptères en captivité, tout en gardant un niveau de biosécurité élevé. Les conditions environnementales et les manipulations impactent fortement le stress de l'animal et peuvent biaiser les réponses à l'infection. Il paraît actuellement, difficile d'envisager une telle stratégie à l'IPC.

Perspectives concernant les astrovirus

La technique de séquençage à haut débit chez les astVs serait à privilégier. Cette stratégie ressort également de mes échanges avec d'autres chercheurs travaillant sur ces astrovirus (Leo Poon, Chen, Z.L. Chi, Ben Hu). Il est très difficile de concevoir des amorces de séquençage à la vue du polymorphisme et de la variabilité des astVs. De plus, la technologie du HTS permet désormais d'appréhender le polymorphisme des séquences et offre de nouvelles opportunités pour comprendre l'évolution et la dynamique des populations virales au sein des hôtes individuels au cours de l'infection (Nelson et Hughes, 2015). C'est donc un outil intéressant pour les astVs qui sont très polymorphes.

La condition *sine qua non* pour mettre en place cette stratégie de séquençage, est d'avoir un échantillon de qualité suffisante. L'isolement et l'amplification sur cellules des astVs de chiroptères, n'étant actuellement pas envisageables, ceci implique une charge virale élevée dans le prélèvement brut, et la nécessité d'intégrer la capture de génome avant un séquençage

à haut débit. Les astVs sont détectés dans les fèces et écouvillons rectaux, échantillons qui contiennent beaucoup de matières contaminantes et d'autres microorganismes.

Cependant, l'étude des coronavirus, hénipavirus ou encore des filovirus sont des perspectives de recherche en santé publique privilégiées dans le contexte actuel. Le manque d'intérêt et de financements alloués pour l'étude des astVs est un écueil important à l'avancée des connaissances sur ce virus.

Perspectives concernant les coronavirus

Chez les CoVs, quelques séquences de spicules ont été obtenues chez des α CoVs à l'aide des techniques mises en place lors de ce travail. Dans l'optique d'une analyse fonctionnelle, il serait intéressant d'obtenir également d'autres séquences de spicule, et notamment chez les β CoV-D.

Encore une fois, les techniques d'enrichissement du génome viral sont à privilégier avant tout séquençage à haut débit sur ces virus. Il a été décidé de collaborer avec l'équipe de recherche de L.F. Wang, de l'université Duke (Singapour) pour obtenir des séquences de spicule par capture de génome. La technique de capture, qui a déjà fait ses preuves sur les CoVs, utilise des sondes plus longues que de simples amorces, et qui sont complémentaires et spécifiques des CoVs à séquencer. Ces sondes seront créées en se basant sur les séquences obtenues jusqu'à présent, au niveau de la RdRp. Dix échantillons de CoVs (β CoV-D) appartenant à l'IPC, ont été envoyés fin juin 2016 (après 14 mois de démarches administratives) et la procédure est en cours.

En parallèle, l'équipe de recherche de UC Davis, gestionnaire du projet PREDICT, a tenté le séquençage du génome par HTS en poolant des échantillons positifs représentatifs de plusieurs groupes de CoVs (*i.e.* α CoV-1, α CoV-2, β CoV-D). Des génomes partiels ont pu être

obtenus. Les résultats partiels nous sont parvenus récemment (3 séquences de spicule), et d'autres échantillons sont en cours de re-séquençage.

Compte tenu du temps imparti, l'objectif d'une analyse fonctionnelle à partir des séquences de spicule, ne rentre plus dans le cadre de la thèse. Elle reste néanmoins une perspective à explorer. L'ensemble des techniques utilisées pour la caractérisation moléculaire de ces virus, ainsi que leurs avantages et leurs limites, sont présentées dans le tableau 11 ci-après.

Dans le but d'évaluer le risque de transmission à l'Homme, le contact avec les hôtes chiroptères représente un autre aspect intéressant et exploitable. Le chapitre suivant étudie la configuration et l'évolution de l'environnement dans la zone d'étude, et l'impact sur les interfaces existantes entre hommes et chiroptères (chapitre 5).

Tableau 11 : Récapitulatif des techniques employées pour le séquençage des astrovirus et coronavirus détectés chez les chiroptères au Cambodge et au Laos.

Technique	Avantages de la technique	Inconvénients de la technique
Séquençage		
Séquençage Sanger	<ul style="list-style-type: none"> • facilité de séquençage (séquençage Sanger habituel) • les amorces sont dessinées à partir des séquences de références et des premiers résultats de séquençage • la PCR nichée permet de travailler sur le premier produit de PCR, et non, l'ARN de l'échantillon • coût 	<ul style="list-style-type: none"> • technique fastidieuse • risque de contamination élevé • ne prend pas en compte la potentielle diversité des séquences
Walking primer	<ul style="list-style-type: none"> • permet de séquencer un long fragment (>1500bp) sans avoir à en connaître la séquence • nécessite d'obtenir un premier amplicon long 	<ul style="list-style-type: none"> • coût assez élevé
Séquençage à haut débit	<ul style="list-style-type: none"> • permet une bonne couverture du génome • permet d'évaluer le polymorphisme • le coût de revient par nucléotide séquencé est faible 	<ul style="list-style-type: none"> • nécessite un échantillon initial riche en matériel génétique viral • nécessite des étapes préliminaires de préparation au séquençage (capture et amplification génomique) • nécessite un long traitement bioinformatique pour l'analyse des données brutes
Amorces de séquençage		
Les amorces dégénérées	<ul style="list-style-type: none"> • permettent de cibler un grand nombre de souches virales pour l'amplification de zones relativement conservées 	<ul style="list-style-type: none"> • sensibilité assez faible • nécessite un échantillon initial riche en matériel génétique viral
Les amorces spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> • permettent d'initier la réaction, de transcription inverse (RT) ou de PCR sur une région précise • bonne sensibilité de la réaction d'amplification par PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • spécificité limitée aux souches d'intérêt ciblées • créer des amorces spécifiques à chaque souche virale ciblée
Les amorces oligo-d(T)	<ul style="list-style-type: none"> • permet d'initier un RT spécifique en amont du génome (queue poly(A)), sans avoir besoin de connaître une séquence spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> • spécifique aux virus possédant un queue poly(A) • capacité de synthèse de la transcriptase inverse conditionne la longueur du brin d'ADNc spécifique synthétisé (ex: avec la SuperScript III de Roche, la capacité de synthèse de l'ADNc est de 12 Kb, permet donc d'obtenir des brins d'ADNc contenant les 12 kb en fin de génome)

Technique	Avantages de la technique	Inconvénients de la technique
<i>préparation au séquençage</i>		
Isolement en culture cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> • permet d'amplifier le virus et récolter du matériel génétique viral en quantité et qualité suffisante pour un HTS 	<ul style="list-style-type: none"> • pas de réussite pour l'isolement des astVs et coVs en cultures cellulaires • qualité de l'inoculum
PCR quantitative	<ul style="list-style-type: none"> • permettrait de connaître la charge virale de l'échantillon avant un séquençage 	<ul style="list-style-type: none"> • difficulté de mettre en pas une PCR quantitative spécifique
Capture de génome par B/S	<ul style="list-style-type: none"> • spécificité de la méthode • capture du génome avant quelconque étape d'amplification : purification de l'échantillon le plus tôt possible 	<ul style="list-style-type: none"> • ne fonctionne pas dans notre cas • ne semble pas fonctionner sur de grands fragments nucléotidiques • nécessite un échantillon initial riche en matériel génétique viral
Capture de génome par technique klenow	<ul style="list-style-type: none"> • spécificité de la méthode • capture du génome avant quelconque étape d'amplification : purification de l'échantillon le plus tôt possible 	<ul style="list-style-type: none"> • ne fonctionne pas dans notre cas • nécessite un échantillon riche en matériel génétique viral • nécessité de connaître la séquence et construire des amorces toutes les 3,5kb
Capture de génome par sondes (L.F. Wang) <i>Duke University</i>	<ul style="list-style-type: none"> • spécificité de la méthode • se base sur des fragments connus plus longs que de simples amorces 	<ul style="list-style-type: none"> • temps imparti, technique non maîtrisée ailleurs et non applicable hors du laboratoire de l'université Duke (l'envoi des échantillons à Singapour a pris 15 mois de démarches administratives)

Chapitre 5: Analyse de facteurs environnementaux potentiels reliés à la présence des coronavirus et astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos

Contexte et objectif de l'étude

Le Cambodge et le Laos sont en constante évolution et ont subi d'importantes modifications de paysage dans les dernières décennies. La région ASE déplore le plus fort taux de déforestation au monde et a déjà perdu 30% de sa couverture forestière lors des 40 dernières années. Selon les estimations hautes, 75% de cette couverture disparaîtra d'ici 2100, ainsi que 42% des espèces mammifères (Sodhi *et al.*, 2004).

En ASE, le Myanmar, le Laos et le Cambodge sont les zones qui connaissent la déforestation la plus dramatique depuis 2010 (FAO, 2009). Les études prédisent que ces deux derniers pays seront les plus touchés par les changements climatiques à venir en ASE, du fait de leur forte dépendance du Mékong et de la faible capacité d'adaptation de la population (IPCC, 2007).

Ces changements rapides de l'environnement ont un impact sur les relations entre l'Homme et son milieu, qui elles-mêmes évoluent. De même, l'évolution de la biodiversité animale est un facteur d'émergence des maladies transmises par certains animaux (Morand *et al.*, 2014; Plowright *et al.*, 2015, chapitre 1), et c'est notamment le cas pour les chiroptères, qui nous intéressent dans cette étude.

L'Homme est à divers titres en contact avec ces animaux, par l'urbanisation, l'exploitation de leurs habitats naturels, la chasse et la consommation de ces animaux. Des travaux sur les virus émergents dans les zones voisines (*i.e.* Thaïlande et Vietnam), ou sur d'autres réservoirs animaux proches des Hommes (*i.e.* rongeurs), ont mis en évidence l'impact de l'évolution de l'environnement sur certains mammifères réservoirs de virus et le risque zoonotique qui en découle (Ripperger *et al.*, 2013; Gay *et al.*, 2014; Blasdel *et al.*, 2016). Il a été vu dans les chapitres précédents, que de nombreuses potentielles souches de coronavirus et d'astrovirus infectent une grande diversité de chiroptères. Certains groupes de virus détectés présentent une spécificité d'hôtes, d'autres sont présents chez plusieurs espèces ou genres de

chiroptères collectés au même endroit, ou dans des sites de collecte différents. L'écologie et les préférences d'habitat de ces hôtes sont très variables en fonction des genres de chiroptères (Kunz et Fenton, 2005), et les changements d'environnement peuvent impacter le mode de vie des chiroptères et les contacts avec l'Homme. Cet aspect est développé dans une revue de la bibliographie présentée dans ce chapitre. Il faut donc appréhender la configuration du paysage, son évolution avec le temps, et évaluer si elles peuvent avoir un impact quelconque sur les chiroptères porteurs de virus dans notre zone d'étude et surtout déterminer si des associations spécifiques existent entre certains virus et des profils environnementaux particuliers. Cet aspect est essentiel pour définir des scénarios de gestion de risque en fonction de l'évolution environnementale de certaines zones et des virus qui leur sont associés.

Dans cette dernière partie, nous analysons les paramètres environnementaux autour des sites de collecte, pour explorer d'éventuelles corrélations avec la présence des chiroptères, ainsi que des virus. D'après les capacités de déplacement des Hommes et des chiroptères, un rayon de 20 km autour des sites de collecte est supposé couvrir l'environnement d'origine des chiroptères échantillonnés. Différentes caractéristiques environnementales dans ces zones (ou AOI pour "Area of Interest") ont été prises en compte dans notre analyse. Elles ont été extraites à l'aide de données cartographiques, démographiques et de couverture forestière, grâce aux outils de système d'information géographique (SIG). Les protocoles utilisés sont détaillés dans l'[Annexe 5](#). La formation aux outils SIG a fait partie du travail de thèse. Une première formation a eu lieu au CIRAD de Baillarguet (France) en Décembre 2015, et la partie pratique du projet s'est déroulée au département de géographie de l'université de Varsovie (Pologne).

Principaux résultats

Au total, 43 aires d'intérêt (AOI) ont été analysées, correspondant aux 43 sites de collecte où la présence de coronavirus et d'astrovirus a été recherchée. Pour visualiser la typologie des milieux, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée à partir des variables environnementales mesurées dans chaque AOI. Ces variables sont actives, c'est-à-dire, prises en compte pour la construction des axes principaux (ou composantes principales) de l'ACP. Douze paramètres initiaux ont été définis mais trois d'entre eux étant liés, non-indépendants, ils ont été exclus de l'analyse qui a été en conséquence conduite sur neuf paramètres : water cover, settlements cover, cropland cover, wetland cover, grassland cover, elevation, forest Shannon index, forest fragmentation index and connectivity index. Les variables supplémentaires ne participent pas à la construction des composantes principales, mais leur visualisation sur le graphe résumant les 9 dimensions définies par les variables environnementales, permet de résumer de façon efficace leurs corrélations avec les variables d'environnement.

L'ACP sur les données environnementales montre des contrastes écologiques qui opposent d'une part les zones anthropogéniques, transformées par l'Homme, avec de nombreuses surfaces cultivées, et peu de forêt, et d'autre part, les zones plus naturelles, avec une forte couverture forestière, des zones herbacées non cultivées et la présence de reliefs (paysages karstiques). L'analyse des données supplémentaires montre une superposition des observations dans les graphes de l'ACP entre les genres chiroptères collectés et la présence de virus spécifiques à ces hôtes dans le même environnement (figures 3 et 4 de l'article). En d'autres termes, l'ACP montre une association spécifique entre certains profils environnementaux et certains types de virus. En ce qui concerne les coronavirus, les betacoronavirus β CoV_D3 and β CoV_D4 sont fortement associés avec un habitat naturel, non

anthropisé et en particulier avec des prairies en altitude plus élevée. Les betacoronavirus du groupe $\beta\text{CoV_D2}$ et à moindre échelle $\beta\text{CoV_D1}$ et $\beta\text{CoV_C}$ semblent être plus corrélés avec le gradient de densité de forêt, $\beta\text{CoV_D2}$ étant particulièrement influencé par la forêt dense. En ce qui concerne les alphacoronavirus, $\alpha\text{CoV_1}$ et $\alpha\text{CoV_2}$, ils sont fortement corrélés avec des milieux anthropisés et des zones humides. Le groupe $\alpha\text{CoV_4}$ est lui au contraire associé avec un habitat naturel. Les astrovirus présentent également une distribution différentielle en fonction des profils environnementaux. Les astrovirus du groupe 7 (chapitre 3, ici, nommés Ung_AstV) sont fortement associés à des environnements naturels, en particulier les prairies en plus haute altitude alors que les astrovirus du group 8 reliés aux astVs murins (ici, nommés Mur_AstV) sont au contraire, fortement associés à un environnement anthropisé. Les astrovirus de chiroptères (chapitre 3, groupes 1 à 6, ici nommés Bat_AstV) semblent quant à eux, associés à des espaces ouverts proches de plans d'eau et de zones humides.

En ce qui concerne les genres de chauves-souris étudiés dans ce projet, ils présentent également une forte structuration en relation avec l'environnement. Le genre *Myotis* est très fortement corrélée avec les environnements anthropisés et les zones humides alors que le genre *Scotophilus* est influencé à la fois par la fragmentation, la présence de plan d'eau et les zones anthropisées. A l'inverse, *Hipposideros*, *Eonycteris*, *Ia* et *Rhinolophus* sont corrélés avec un habitat naturel de forêt dense et de prairies en plus haute altitude. Le genre *Rousettus* ne semble pas montrer de préférence particulière alors que les genres *Megaderma* et *Taphozous* semblent opposés à tous les paramètres environnementaux utilisés, suggérant que d'autres paramètres, non inclus dans l'analyse, dirigent leur distribution.

ARTICLE

-Revue de la littérature :

Loss of forest habitats and its impact on bat populations in South East Asia: a literature review.

A. Lacroix, P. Buchy, R. Frutos, A. Afelt

- Le manuscrit, en préparation, sera soumis au journal *Ecohealth*, dès que les données concernant la détection des astrovirus et des coronavirus au Cambodge et au Laos (*i.e.* les deux premiers articles) seront publiées.

Loss of forest habitats and its impact on bat populations in South East Asia: a literature review.

A. Lacroix, P. Buchy, R. Frutos, A. Afelt

Review written at the Institute of Physical Geography, Faculty of Geography and Regional Studies, University of Warsaw, Warsaw, Poland

May, 2016

Introduction

South-East Asia (SEA) hosts 320 species of bats, representing 30% of the known global bat fauna (Kingston, 2010). Bats are known to provide many economic and environmental services. They play a role in insect population control (Kunz *et al.*, 2011). They are also seed dispersers and major pollinators of many plants with important economic value, like durian (Bumrungsri *et al.*, 2013, 2009). Bats are often hunted for food (Mildenstein *et al.*, 2016). In Cambodia and Vietnam, bats are bred for guano which is used as a plant fertilizer (Thi *et al.*, 2014). It has been proven that bats play a role in many

emerging zoonotic diseases: they are reservoirs for many viruses which can be transmitted to humans through direct or indirect contact and be pathogenic, such as rabies, SARS-Coronavirus or Ebola (Calisher *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2015).

After the Severe Acute Respiratory Syndrome pandemic in 2002 and 2003, which contaminated more than 8000 persons and killed 774 of them throughout the world, scientists discovered that the responsible virus originated from bats (Wang *et al.*, 2006). This finding, in addition to the discovery of other deadly viruses from bats in Australia (*i.e.* Australian Bat Lyssavirus, Hendra virus) and Malaysia (Nipah virus) a few years before, convinced the scientific community to enhance the research on these hosts. Today, more than 70 viruses have been detected in bats.

Virus spillover and emergence of novel hosts, including humans, involve many ecological drivers as well as a complex mixture of processes (figure 1).

The system of an emerging infectious disease (EID) can be considered as a dynamic system of 4 components: (i) the bat population, (ii) the human population, (iii) the environment and (iv) the virus population (figure 1). The transmission of a zoonotic pathogen is not only linked to the pathogen itself, but also to bats, to humans, and the environment where they evolve. Once the pathogen and host ecologies are known, the impacts of anthropogenic changes can be fully appreciated. This is summarized in the "One Health" concept which links the animal, the human and the (health of the environment to assess the issue of an emerging zoonosis.

A learning from the SARS or the Nipah episodes was interdisciplinary approaches are required to understand the interaction between human hosts and pathogen ecology (Anti *et al.*, 2015; Brook and Dobson, 2015; Mayer, 2000; Wong *et al.*, 2007).

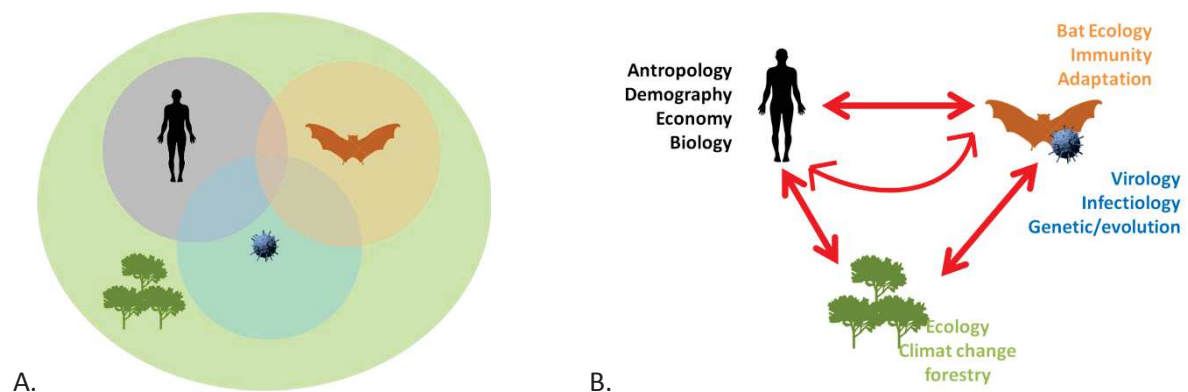


Figure 1: The dynamic system between humans, bats, viruses and the environment. Each component has its own level of complexity and is linked with many other factors. (A) The four components interact with each other. (B) Other external and internal factors impact on each component. For example, the ecology of bats is important in order to know the environment where they settle. In the latter environment, human activities evolve and lead to increased direct or indirect contact with bats. This evolution is linked to cultural aspects or economical context. *Example of scenario: climate changes have an impact on bat and human ecosystems. Humans can also have an impact on bats' ecosystems, through economical activities, agriculture, and development. Faced with a disturbed ecosystem, bats adapt their behavior to survive, living closer to humans.*

SEA is considered a hotspot for emerging diseases (Jones *et al.*, 2008). This region encompasses very fast changes in terms of demography, economy and human activities leading to dramatic consequences on landscapes and biodiversity. Impacts on loss and disturbance of natural environment of bats' biodiversity in SEA are poorly documented. Nevertheless, few studies evidence consequences on bat ecology and raise the risk of transmission of pathogens to humans. Bat populations as well as other wildlife, adapt to disturbed ecosystems, leading to them settling closer to humans. This enhances the risk of interactions between humans and bats. The first part of this review presents the main drivers of forest loss in SEA, with a special focus on Cambodia and Lao PDR. Impacts on bat population diversity and ecology are presented in the second part.

I. Loss of forest habitat and consequences on bat populations

I. 1. Loss of forest in SEA

One of the most significant threats to the bat diversity is habitat loss (Kingston, 2008). Relative deforestation rates in Southeast Asia are the highest of any tropical region and are expected to lead to the extinction of many bat taxa (Achard *et al.*, 2002; Sodhi *et al.*, 2004; Stibig *et al.*, 2007).

The Greater Mekong Subregion (GMS), composed by the countries linked to the Mekong rivers, lost 30% of its forest cover since 1970 (figure 2)(Costenbader *et al.*, 2015). According to upper bond estimates, SEA is predicted to lose 75% of its original forest and 42% of the mammal species by 2100 (Sodhi *et al.*, 2004).

Thailand and Vietnam were the first to experience significant deforestation due to an important population growth and the conversion of forests into agricultural lands (the forest cover declined from 55% in 1954 to 13.3% in 2000) (Entwistle *et al.*, 2008).

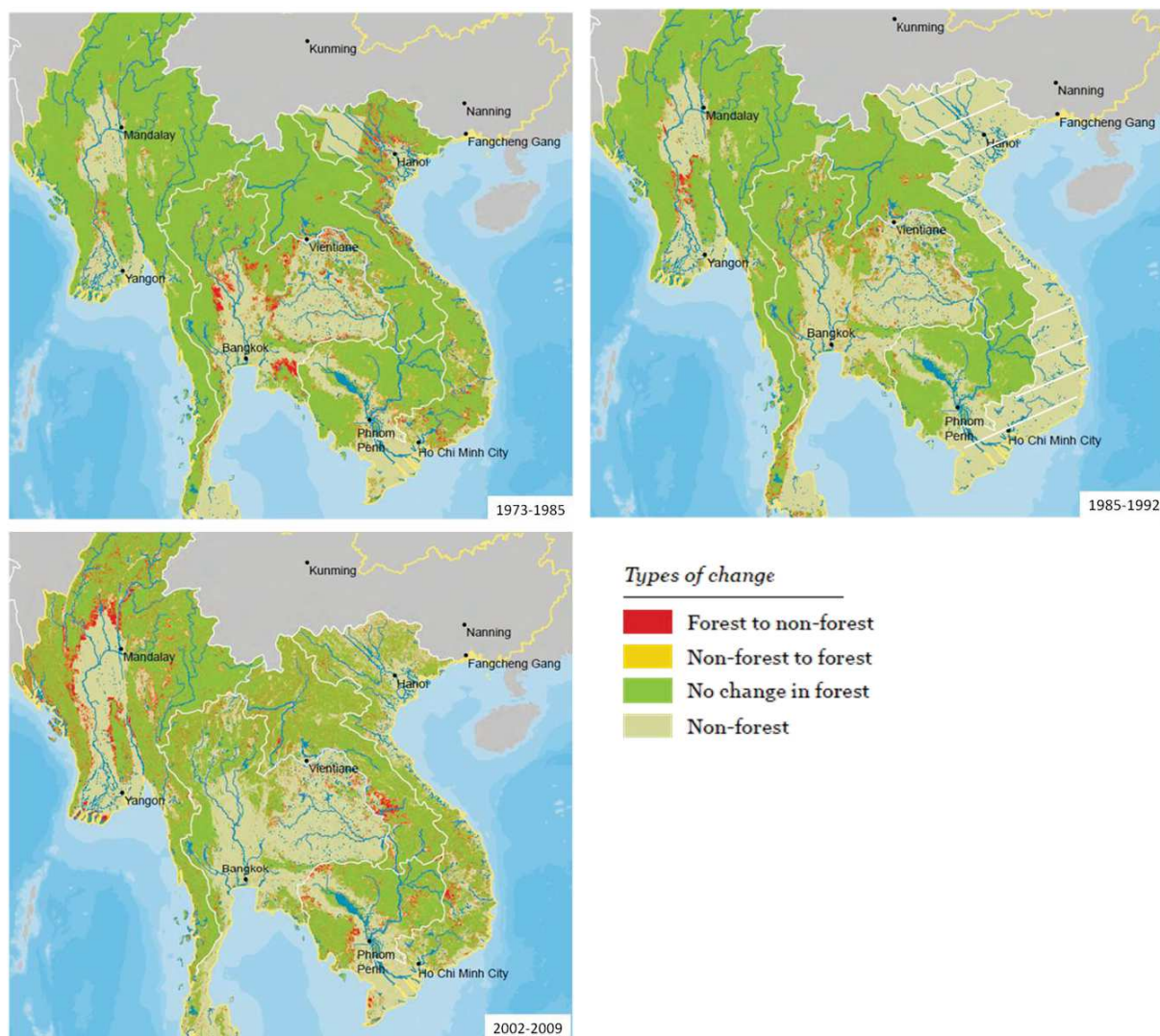


Figure 2: Spatial distribution of forest cover changes in SEA during 3 successive time periods: 1973-1985, 1985-1992 and 2002-2009. source: WWF-Greater Mekong Program based on multiple datasets (WWF, 2013). Data is not available for Vietnam between 1985 and 1992.

Between 1973 and 2014, Cambodia lost almost 25% of its forest cover (table 1), and has an annual deforestation rate of 218,800 hectares (FAO, 2009; WWF, 2013). As a consequence of the implementation of logging bans in Thai and Vietnamese territories, Lao PDR, as well as Myanmar, experienced heavy forest losses between 2002 and 2009 (13% and 15% respectively).

Table 1: Evolution of forest cover percentage in Cambodia between 1973 and 2014. The total forest declined from 72% in 1973 to 48% in 2014, while dense forest^{*1} has decreased from 42% to 16% over the same period. The level of mixed forest^{*2} cover has stayed relatively stable over this period (data from Open Development Cambodia, 2015).

Year	Forest cover	Dense forest ^{*1}	Mixed forest ^{*2}	Water	Non forest
1973	72.11	41.88	30.23	2.87	24.29
1989	67.92	38.99	28.92	2.64	29.35
2000	66.65	34.52	32.13	3.20	30.01
2004	63.05	30.66	32.39	2.51	33.95
2009	60.18	22.55	37.63	2.45	36.81
2014	47.68	16.45	31.23	3.67	48.41

^{*1} Dense forest is defined as "evergreen forest" and "semi-evergreen forest" by the Forestry Administration's Cambodia Forest Cover 2010. Global Forest Watch organisation and Open development Cambodia approximated that dense forest is represented by a canopy cover greater than 60%.

^{*2} Mixed forest includes regrowth forest, stunted forest, mangroves, inundated forest, bamboo, and also forest plantations growing rubber, acacia, and eucalyptus or other tree crops.

Mixed forest is defined as "deciduous forest" and "other forest" by the Forestry Administration's Cambodia Forest Cover 2010. "grass land" and "wood shrub land evergreen and wood shrub land dry" are also included in this classification, due to the limitation of color differentiation on the available satellite images.

The FAO projected that Cambodia, Lao PDR and Myanmar will be the places where loss of natural forest will be the most dramatic in SEA in the next decades. A total of 4.8 million hectares of forest are estimated to be lost from 2010 to 2020 (FAO, 2009).

Moreover, according to the fifth Assessment Report (AR5) of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Lao PDR and Cambodia are considered regions among the most vulnerable to climate change, due to their reliance on the Mekong river, and the low adaptive capacity of its people (IPCC, 2007).

I. 2. Drivers of deforestation in SEA

Brandt *et al.* defined five principal drivers leading to deforestation and modification of landscapes (Brandt *et al.*, 1999): socio-economical, political, technological, natural and also cultural.

Forest loss between 2000 and 2005 was positively correlated with urban population growth and exports of agricultural products (Defries *et al.*, 2010).

Global and local demand of rice (*Oryza sativa*) increased over the time. Additionally, in SEA, forests have been converted into monoculture plantations of economically important species, like rubber trees (*Hevea brasiliensis*), oil palm (*Elaeis guineensis*), coconut (*Cocos nucifera*) plantations. These three species account for 20 to 30% of the cultivated area in SEA (Sodhi *et al.*, 2004).

Conversion of forest into crop production is the most significant factor in deforestation (Poffenberger, 2009). In Cambodia, agricultural lands expanded from 26% to 31% between 1997 and 2007 (Broadhead and Izquierdo, 2010) and to 32% in 2011 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015).

Asian timber has also been in high demand since the middle of the last century (Flint, 1994). Those needs were included in political programs, laws and policies of many countries (Bürgi *et al.*, 2004; Defries *et al.*, 2010). In the meantime, improvement and evolution of technical material and equipment enhanced the production capacity. The market economy and WTO agreements (World Trade Organization) also enhanced the production and trade of those products at the global scale. Some countries boosted the trade at the national level, such as the Cambodian government which introduced land concessions via the 2001 Land Law, allowing agricultural cooperation to develop plantations (Bürgi *et al.*, 2004). Affected by the Vietnam War, Lao PDR allowed forest conversion from foreign investments to boost

economic development. In Cambodia, illegal logging started during its civil war between 1970 and 1990, and still persists.

Uncontrolled forest fires by humans or during El Niño events lead to the forest canopy and structure to be disturbed and damaged, making it more vulnerable (Woodward *et al.*, 2000).

Poffenberger analyzed the drivers of deforestation in the case of Cambodia (Table 2). The strategies proposed to reduce the phenomenon show the complexity of the task at the cultural, political, educational level at different scales of the territory (Poffenberger, 2009).

Table 2: Drivers of deforestation in Cambodia at international, national and regional scales, and potential mitigation strategies (Poffenberger, 2009).

MAJOR DRIVERS OF DEFORESTATION	POTENTIAL CF MITIGATION STRATEGIES
INTERNATIONAL	
Commodity Markets — rapidly rising prices of sugar, rubber, and palm oil	Controlling commodity prices is beyond the national and sub-national project capacity.
Investment Capital — for commercial plantations and land speculation	Trans-boundary capital flowing into forest land development may be subject to national government control, especially related to policies on issuing concessions to foreign firms or investors.
NATIONAL	
Military — military bases and roads for legitimate defence purposes, as well as support to illegal logging and encroachment on forests by soldiers	National defence needs will likely trump forest conservation, though more routine military demands on forests may be negotiated at the national level — a dialogue between forestry officials and military commanders may be required to resolve illegal activities.
Government Officials — local government officials engaged in illegal land sales and forest clearing	Transparent and public meetings between national government planners and local government officials can communicate the importance of protecting project areas from manipulation and illegal activities.
Economic Land Concessions — large tracts of forest land allocated to private sector firms displace local residents and stimulate social conflict	Senior forestry staff and national REDD project directors need to be in close dialogue with key Ministries and committees involved in issuing Economic Land Concessions, as well as long-term public land planning processes.
SUB-NATIONAL	
Forest fires — suppress natural regeneration of degraded forests, create carbon emissions from burning	Hunters, gathers, farmers and other forest users who often start fires need to be advised and monitored by the community. Fire control strategies require funding, tools, and capacity building to maintain firelines and suppress fires.
Migrant Encroachment — migrants seeking forest land to farm or resell	Educate migrants regarding community protected forest territory, combined with patrolling, demarcation of boundaries and sanctions for land clearing.
Land Speculation — forests are felled to establish a claim on land that is later sold, or resold as land prices increase	Identify middlemen financing forest land grabs and report forest crimes to the police, local government, and forestry agency. Monitor areas. Patrols, boundary demarcation and signage is also required throughout the project area.
Agricultural Expansion — population growth drives additional forest clearing for agricultural land creation	Community-based land use planning exercises to identify existing and future agricultural land. Design and implement sustainable agricultural intensification project to raise productivity.
Illegal Logging — 'high grading' of luxury woods causes ongoing forest degradation and loss of biomass	Limiting access of illegal loggers with small tractors through patrols, trenching along boundary access points, identifying agents and gaining support of forestry agency, police, and military
Firewood Consumption — 90% fuel use from wood with increasing demands from subsistence and commercial users	Introduction of fuel-efficient wood stoves in early project phase with gradual transition to liquid petroleum gas and solar.

Since Lao PDR and Cambodia are lands of a high bat diversity (90 and 70 bat species respectively), and because some viruses have been found in the bat population, impacts of change on bat diversity, and the virus they can carry, need to be investigated in these areas.

So far, only a few studies have been carried out in neighboring countries as well as in the neotropical region.

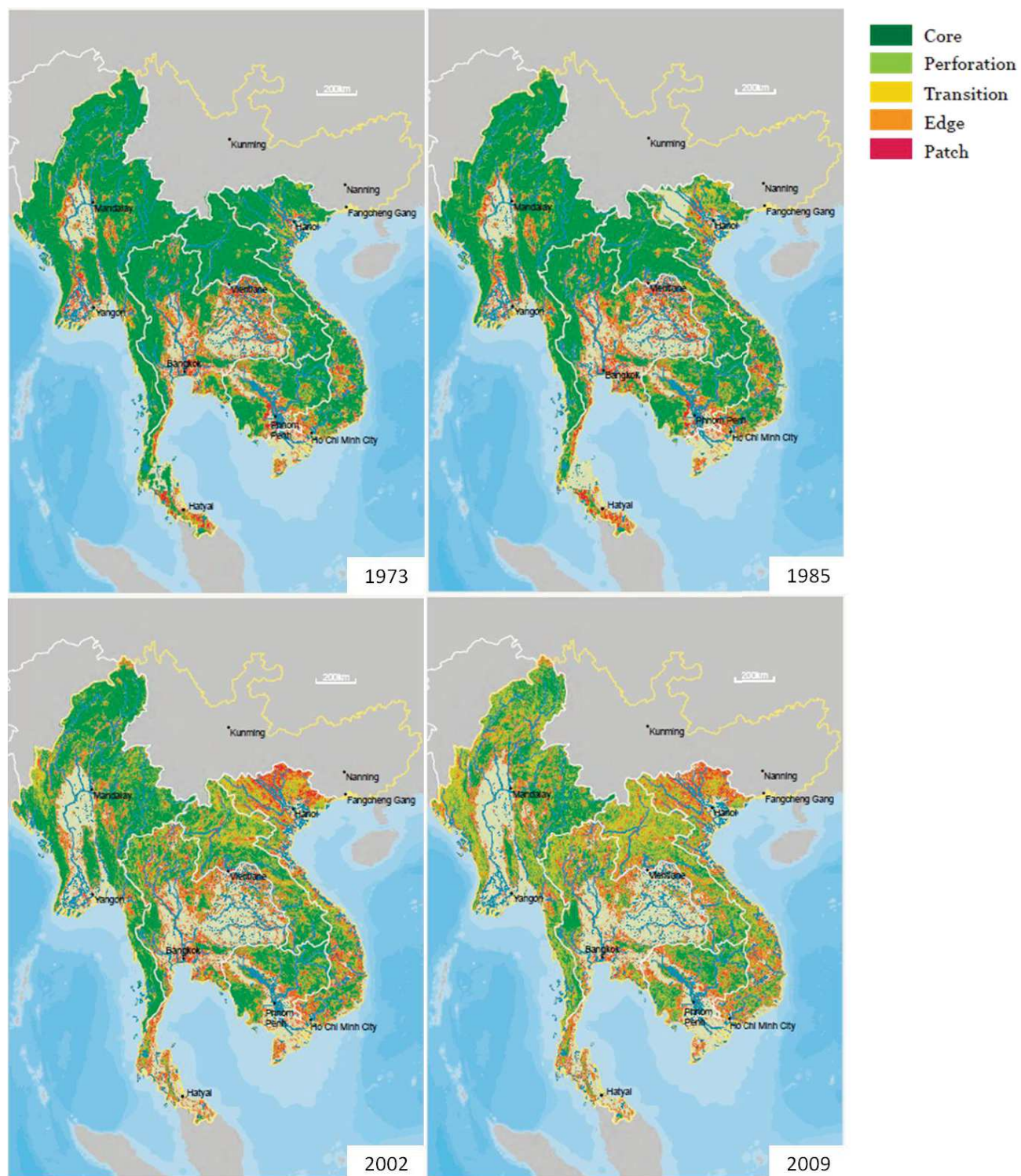
I. 3. Forest fragmentation in SEA

Spatial patterns of habitat need to be taken into consideration. There is evidence from different biomes and animal models that the evolution of the habitat configuration in time may influence landscape characteristics, such as functional connectivity, edge and matrix effects, and thus population viability (Aben, 2012; Villard and Metzger, 2014). Understanding effects of habitat fragmentation on bat populations or communities is critical, not only for the purpose of biodiversity conservation, as they provide vital services to ecosystems via pollination and seed dispersal (especially in tropical and subtropical habitats), but also for the identification of possible bat to human contact zones, as bats represent potential reservoirs of zoonotic pathogens.

Fragmentation happens when road construction or land otherwise used by humans cut a natural habitat into smaller patches. This decreases forest areas but also leads to isolation of the remaining patches and their residents. In addition, fragmentation increases the proportion of edge habitat, dries soil and raises the risk of fires (Riitters *et al.*, 2000). It impacts on movements of wide ranging and migratory species, and can facilitate entry as well as spread of invasive species. Further, by opening access into forests, humans facilitate

access to illegal bushmeat hunting and logging. All these causes lead to altered remaining habitats and disturbed ecosystem equilibria (Laurance *et al.*, 2011).

Forest fragmentation in SEA between 1973 to 2009 has been calculated following the method of Riitter *et al.* (2000) (figure 3 A) . Five levels of fragmentation were recognized through this method: from "Core" corresponding to zones of continuous forest to the "perforation" level, representing areas of non-forest inside a forest zone (WWF, 2013).



(A)

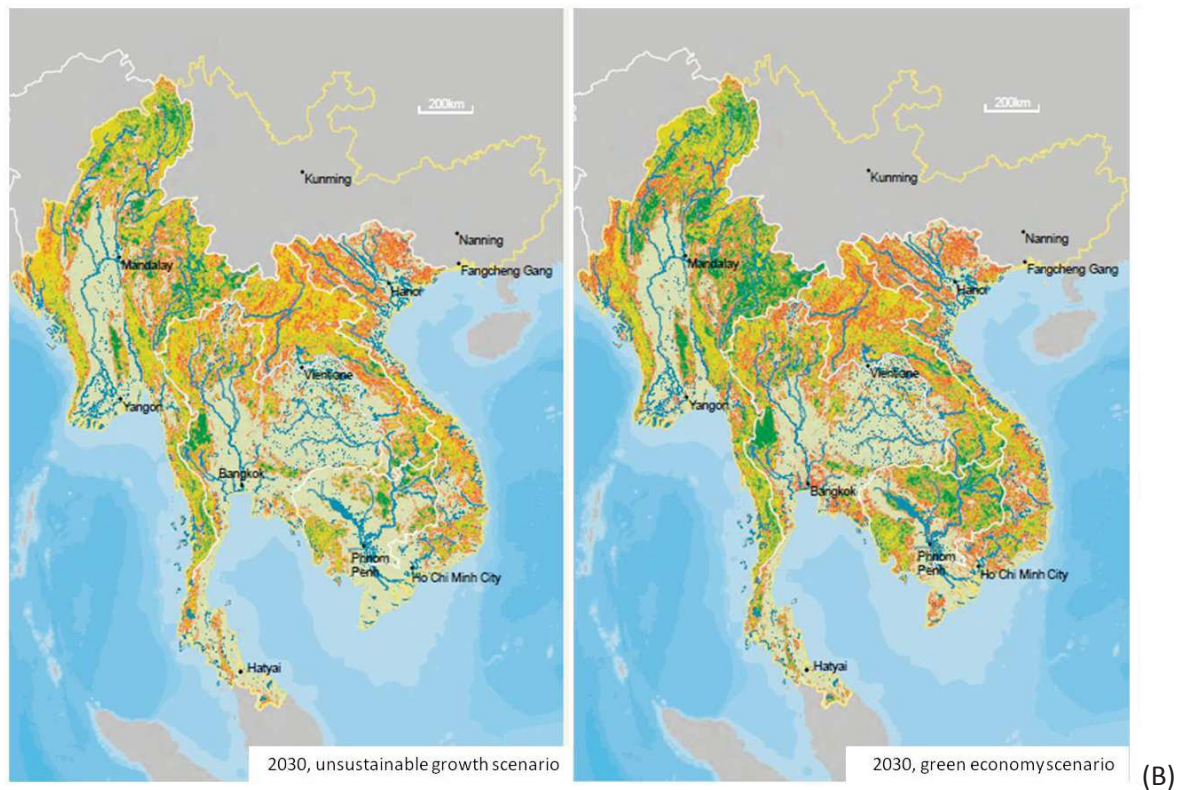


Figure 3. Fragmentation index for forests in the Great Mekong Subregion (GMS) between 1973 and 2009 (A) and potential fragmentation for 2030, under two future scenarios (B) (WWF, 2013). The unsustainable growth model assumes a constant rate of deforestation, based on the observed 2002–2009 change from forest to agriculture. The green economy scenario assumes a reduction of 50% in the overall deforestation rate.

The levels of fragmentation were defined based on a neighborhood analysis of each pixel forest cover maps (Riitters *et al.*, 2000), and are described as follows: *Core*: Interior zones within a continuous forest. *Patch*: primarily small patches of less connected forest dispersed from a core area. *Transition*: between core and patch typology (areas with approximately 40–60 per cent forest that are at the limits of connectivity). *Edge*: forested pixels bordering “non-forest”. *Perforation*: an area of non-forest inside forest.

Over time, natural forest in Lao PDR has been severely fragmented, leading to forest at the “edge” and “transition” status, comprising patches corresponding to areas where population development occurred. In Cambodia the forest landscape has become heterogeneous and reached the status of perforation, with zones of continuous forest (under protection), and fragmented patches on the outer edge of the forest areas.

Since Lao PDR and Cambodia are considered to be among the most vulnerable regions to climate change (IPCC, 2007), the evolution of forest cover and configuration is likely to be

further affected by 2030, and to have a negative impact on wild forest-dependent species, including bats (Meyer *et al.*, 2016) (figure 3B).

II. Impact of forest loss on bat populations

II. 1. Bats reflect environment changes

Bats represent 21% of the global mammal diversity. They are very sensitive to climate and environmental changes. Widely spread around the world and displaying high ecological specificities, they constitute excellent bio-indicators for ecology, and climate monitoring (Jones *et al.*, 2009).

Indeed, bats occupy high trophic levels due to their high positions in the food chain. They also perform ecosystem services (Kunz *et al.*, 2011). As a consequence, bats are likely to reflect the changes happening in the environment and on organisms at lower trophic levels.

Bats are sensitive to habitat configuration. They are linked to food resources, like water surfaces or fruit trees for insectivorous and frugivorous bats respectively. Bat population structures (and especially forest-depending species) have been shown to be heavily affected by urbanization, forest loss and fragmentation (Cosson *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 2010).

Because of a slow reproductive rate and long life span, bat populations are relatively stable. A decline of populations may be caused by changes in the natural habitat (Fenton *et al.*, 1992). Additionally, bats are known to be reservoirs of a wide range of emerging infectious diseases, whose epidemiology may also reflect environmental stress.

II. 2. Effect of habitat loss and fragmentation on bat population structure

Learning's from the Neotropics

To date, the majority of studies on the effect of habitat disturbance on tropical bats have been carried out in the Neotropics, where bat assemblages in forests are dominated by members of the *Phyllostomidae* family (table 3). While some of these studies revealed predictable declines in overall bat species richness and abundance in logged forest sites (Estrada-Villegas *et al.*, 2010; Meyer and Kalko, 2008; Pons and Cosson, 2002), others highlighted that responses to habitat change and fragmentation are species-dependant, and vary with bats' ecological specificities (Delaval and Charles-Dominique, 2006; Meyer *et al.*, 2008; Presley *et al.*, 2008). Despite their high mobility, bats are not secure from genetic erosion in anthropogenically modified landscapes (Cisneros *et al.*, 2015; Ripperger *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, 2003). Surprisingly, in well-managed forest stands, neotropical bats have been shown to recover well from habitat disturbance (*e.g.* Clarke *et al.*, 2005; Willig *et al.*, 2007), underlining the importance of ecosystem management.

Situation in the Paleotropics

Far fewer studies have focused on the responses of Paleotropical bats to environmental disturbance. Extrapolations from studies in the Neotropics remain limited as they are dominated by insectivorous species not found in the Old World. Malaysia and Borneo concentrated most of their studies on bat responses to landscape evolution in the Paleotropics, during the past decade (Table 3).

Forest dependant bats belonging to the families of *Rhinolophidae*, *Hipposideridae*, *Kevrivoulinae* are particularly vulnerable to forest loss and degradation (Kingston, 2013;

Struebig *et al.*, 2011). Sensibility of bats to habitat disturbance also depends on the ecology and biology of each bat genus. In Malaysia, insectivorous bat species roosting in trees have been shown to be more affected in diversity and abundance by habitat fragmentation, than cave roosting bats species (Struebig *et al.*, 2008). In general, Cave-roosting species seem to be more resilient to fragmentation and degradation compared to species that depend directly on forest structures for their roosting (Kingston, 2013). Nevertheless, maintaining limestone karst outcrops remains crucial for cave-roosting bat's diversity and sustainability (from genera *Hipposideros* and *Rhinolophus*) in a fragmented landscape (Struebig *et al.*, 2009).

On Borneo Island, which experienced forest losses, logging and conversion of forest into monocultures, as well as differences in species composition of bat communities between repeatedly logged forests, forests regenerating from clearance, and old-growth forests were evidenced. Studies showed that, logging had little effect on bat-species' richness after several rounds of forest extraction in the most heavily degraded forests. This raises the hypothesis that a threshold in landscape modification could be reached for bats to respond (Struebig and Turner, 2013).

In Thailand, conversion of tropical rain forest into monoculture rubber plantation lead to a lower insectivorous bat diversity (mostly from *Hipposideridae*, *Rhinolophidae*, *Vespertilionidae* families) compared to natural forested areas, due to the low insect biomass in monoculture landscapes (Phommexay *et al.*, 2011).

Corridors between forest patches and transformed areas acted as transition zones for insect and thus the bats feeding on them. Such a land conversion scenario is happening in Cambodia, especially in the Eastern country (Wildlife, 2014), where bats have been found to

harbor coronaviruses from the MERS-CoV lineage. This suggests the necessity to investigate whether bats respond to environmental changes, especially since bats are in closer contact with humans.

To conclude, it has been difficult to establish definitive responses to how bat communities react to forest disturbance and logging for several reasons: (i) responses to habitat disturbance are deeply related to ecological specificities of bat species, (ii) the extent of disturbances varies between sites and remains difficult to be compared, (iii) the methodology and time lapse of bat following up impact on findings (trapping by miss net, echolocation following up, etc) and have to be adapted to ecological specificities of bats.

Table 3: Studies on bats' responses to forest modification in the Neotropics and Paleotropics

Reference	Location	Main results
<i>Neotropics</i>		
Pons and Cosson, 2002	Mexico	Significant differences in species diversity of <i>Phyllostomidae</i> bats with habitat disruption. Bats were significantly more present at forested than deforested sites and thus appeared to be useful indicators of habitat disruption.
Meyer <i>et al.</i> , 2008	Panama	Meyer studied and compared hypotheses on the causes of habitat loss and forest fragmentation on distribution and diversity of 23 neotropical bat species in Panama. The landscape fragmentation sensitivity of bats depends on their tolerance to habitat edges and their mobility.
Meyer and Kalko, 2008	Islands of Gatun Lake, Panama	The species richness and assemblage of phyllostomid bats at continuous forest-edge compared with that at interior forest sites, suggests that the vegetation structure, as well as the distance from the mainland and forest cover in each patch, matter.
Estrada-Villegas <i>et al.</i> , 2010	Panama	A general negative impact of forest fragmentation on species richness, abundance and feeding activity of forest-dependant insectivorous bats.
Sampaio <i>et al.</i> , 2003	Brazil	In the Amazon forest, the response of bats to forest structures (continuous forest and forest fragments) has been found highly dependent on bat species.
Delaval and Charles-Dominique, 2006	French Guiana	Frugivorous and nectarivorous bat communities respond positively to fragmentation of forests, despite a decrease of bat species' richness corresponding to a significant loss of diversity of food resources due to the edge effect.
Klingbeil and Willig, 2009	Amazon forest	Frugivorous and nectarivorous bats respond positively to landscape fragmentation (increase of forest patches and reduction of canopy cover), due to better access to food resources. - Bats (being gleaning animals) respond to landscape fragmentation by exploring more fragmented areas presenting low contrast edges and invest patches presenting higher quality of resources.
Presley <i>et al.</i> , 2008	Amazon forest, Brazil	In well-managed forest stands, logging systems lead to a decrease in gleaning insectivorous bats and an increase in frugivorous species.

Ripperger <i>et al.</i> , 2013	Costa Rica	the genetic diversity forest-dependant bat population (<i>Dermanura watsoni</i>) increases with the fragmentation of the forest and is patch-size dependant.
--------------------------------	------------	--

Clarke <i>et al.</i> , 2005	Victoria-Mayaro Forest Reserve, Trinidad	<ul style="list-style-type: none"> -Study on 38 species of bats -Species richness was found to be similar among primary forest and logged forest habitats, although logging systems lead to a decrease in animal gleaning bats and an increase in frugivorous bats. -A measured use of tropical forests can largely be compatible with biodiversity conservation.
-----------------------------	--	--

Paleotropics

Struebig <i>et al.</i> , 2008	Malaysia	Insectivorous bat species roosting in trees (cavities, or foliage) are more vulnerable in diversity and abundance to habitat fragmentation, than cave roosting bats species
-------------------------------	----------	---

Struebig <i>et al.</i> , 2009	Borneo	Importance of limestone karst outcrops for maintaining cave-roosting bat diversity (from genera <i>Hipposideros</i> and <i>Rhinolophus</i>) in a fragmented landscape
-------------------------------	--------	--

Struebig and Turner, 2013	Borneo	<ul style="list-style-type: none"> -Differences in species composition of cave bat species, egde bat species and forest bat species between repeatedly logged forest, forests regenerating from clearance, and old-growth forest. -Logging had little effect on bat-species richness after several rounds of forest extraction at the most heavily degraded forest.
---------------------------	--------	---

Struebig <i>et al.</i> , 2011	Borneo	Evidence of the parallel declines in abundance and genetic diversity of bat species in tropical forest fragmentation.
-------------------------------	--------	---

Phommexay <i>et al.</i> , 2011	Thailand	-Insectivorous bat diversity and activity were found to be much lower in lands transformed into rubber plantations than in forested areas (lower food resources in transformed monoculture lands than in the original forest)
--------------------------------	----------	---

II. 3. Other drivers impacting bat populations

In addition to the forest conversion and forest fires, other drivers, related to human activities and behaviors, threaten the biodiversity, increasing the contact with humans, and the risk of pathogen transmission:

-wildlife trade: In 2002, Bennet estimated that wildlife was being extracted from tropical forests at more than six times the sustainable rate (Bennett, 2002). Despite some regulations from the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) agreements, an alarming number of wildlife resources are legally or illegally traded in SEA.

-hunting for bushmeat: bat hunting for consumption and medicine affect 13% of the worldwide bat species, and have been shown to have a significant impact on bat populations in the Pacific islands and South-East Asia (Mickleburgh *et al.*, 2002). With the exception of Singapore, bat hunting is widespread in 10 of the 11 SEA countries (Brunei, Cambodia, Indonesia, East Timor, Laos, Malaysia, Myanmar, Philippines, Thailand, and Vietnam) and affects 64 species (Mildenstein *et al.*, 2016).

So far, no study has been carried out on the response of bats to habitat disturbance in Lao PDR and Cambodia, although both countries have experienced important and fast forest losses and landscape transformations. Hence, as bats from Cambodia and Lao PDR have been shown to harbor viruses related to zoonotic strains, and as interfaces between them and humans increase due to landscape modification, there is a necessity to better understand whether bat populations evolve. Indeed, there is a necessity to what extent bats interact with humans, exposing them to potential viruses.

Conclusion

Loss of habitat has been shown to impact on bat populations. However, bat are affected in different ways, depending on the species and their diet. There is a necessity to investigate the current and further situation of bat communities in the Southeast Asian region as it encompasses important habitat loss and transformation. This suggests to improve the general knowledge on bat ecology in this area, which evolve to implement a dynamic on research and bat communities following up.

References

- Achard, F., Eva, H.D., Stibig, H.-J., Mayaux, P., Gallego, J., Richards, T., Malingreau, J.-P., 2002. Determination of Deforestation Rates of the World's Humid Tropical Forests. *Science* 297, 999–1002. doi:10.1126/science.1070656
- Anti, P., Owusu, M., Agbenyega, O., Annan, A., Badu, E.K., Nkrumah, E.E., Tschapka, M., Oppong, S., Adu-Sarkodie, Y., Drosten, C., 2015. Human-Bat Interactions in Rural West Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1418–1421. doi:10.3201/eid2108.142015
- Bennett, E.L., 2002. Is There a Link between Wild Meat and Food Security? *Conserv. Biol.* 16, 590–592. doi:10.1046/j.1523-1739.2002.01637.x
- Broadhead, J., Izquierdo, R., 2010. Assessment of land use, forest policy and governance in Cambodia. Phnom Penh Cambodia FAO.
- Brook, C.E., Dobson, A.P., 2015. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 23, 172–180. doi:10.1016/j.tim.2014.12.004
- Bumrungsri, S., Lang, D., Harrower, C., Sripaoraya, E., Kitpipit, K., Racey, P.A., 2013. The dawn bat, *Eonycteris spelaea* Dobson (Chiroptera: Pteropodidae) feeds mainly on pollen of economically important food plants in Thailand. *Acta Chiropterologica* 15, 95–104.

- Bumrungsri, S., Sripaoraya, E., Chongsiri, T., Sridith, K., Racey, P.A., 2009. The pollination ecology of durian (*Durio zibethinus*, Bombacaceae) in southern Thailand. *J. Trop. Ecol.* 25, 85–92.
- Bürgi, M., Hersperger, A.M., Schneeberger, N., 2004. Driving forces of landscape change — current and new directions. *Landsc. Ecol.* 19, 857–868. doi:10.1007/s10980-004-0245-8
- Calisher, C., Childs, J., Field, H., Schountz, T., Holmes, K., 2006. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Publ. Zoonotics Wildl. Dis.*
- Cisneros, L.M., Fagan, M.E., Willig, M.R., 2015. Effects of human-modified landscapes on taxonomic, functional and phylogenetic dimensions of bat biodiversity. *Divers. Distrib.* 21, 523–533. doi:10.1111/ddi.12277
- Clarke, F.M., Pio, D.V., Racey, P.A., 2005. A Comparison of Logging Systems and Bat Diversity in the Neotropics. *Conserv. Biol.* 19, 1194–1204.
- Costenbader, J., Broadhead, J., Yasmi, Y., Durst, P.B., 2015. Drivers Affecting Forest Change in the Greater Mekong Subregion (GMS): An Overview.
- Defries, R.S., Rudel, T., Uriarte, M., Hansen, M., 2010. Deforestation driven by urban population growth and agricultural trade in the twenty-first century. *Nat. Geosci.* 3, 178–181. doi:10.1038/ngeo756
- Delaval, M., Charles-Dominique, P., 2006. Edge effects on frugivorous and nectarivorous bat communities in a neotropical primary forest in French Guiana. *Rev. Décologie* 61, 343–352.
- Entwisle, B., Rindfuss, R.R., Walsh, S.J., Page, P.H., 2008. Population growth and its spatial distribution as factors in the deforestation of Nang Rong, Thailand. *Geoforum, Conversations Across the Divide* The Time and Place for Political Ecology: The Life-Work of Piers Blaikie Biocomplexity in Coupled Human-Natural Systems: The Study of Population-Environment Interactions 39, 879–897. doi:10.1016/j.geoforum.2006.09.008
- Estrada-Villegas, S., Meyer, C.F.J., Kalko, E.K.V., 2010. Effects of tropical forest fragmentation on aerial insectivorous bats in a land-bridge island system. *Biol. Conserv.* 143, 597–608. doi:10.1016/j.biocon.2009.11.009
- FAO, 2009. Assessing the protection of forest-based environmental services in the Greater Mekong subregion (No. Working Paper No. APFSOS II/WP/2009/14,). Asia-Pacific Forestry Sector Outlook Study II Working Paper Series, Bangkok, Thailand.
- Fenton, M.B., Acharya, L., Audet, D., Hickey, M.B.C., Merriman, C., Obrist, M.K., Syme, D.M., Adkins, B., 1992. Phyllostomid Bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as Indicators of Habitat Disruption in the Neotropics. *Biotropica* 24, 440–446. doi:10.2307/2388615
- Flint, E.P., 1994. Changes in land use in South and Southeast Asia from 1880 to 1980: A data base prepared as part of a coordinated research program on carbon fluxes in the tropics. *Chemosphere* 29, 1015–1062. doi:10.1016/0045-6535(94)90166-X

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015. FAO GEONETWORK. GADM database of Global Administrative Areas (GeoLayer). <http://data.fao.org/ref/48a5cab8-1f15-41ff-b530-673580735373.html?version=1.0>.

Han, H.-J., Wen, H.-L., Zhou, C.-M., Chen, F.-F., Luo, L.-M., Liu, J.-W., Yu, X.-J., 2015. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* doi:10.1016/j.virusres.2015.05.006

Job Aben, F.A., 2012. Effects of matrix composition and configuration on forest bird movements in a fragmented Afromontane biodiversity hotspot. *Anim. Conserv.* 15, 658–668. doi:10.1111/j.1469-1795.2012.00562.x

Jones, G., Jacobs, D.S., Kunz, T.H., Willig, M.R., Racey, P.A., 2009. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. *Endanger. Species Res.* 8, 93–115. doi:10.3354/esr00182

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. doi:10.1038/nature06536

Kingston, T., 2013. Response of Bat Diversity to Forest Disturbance in Southeast Asia: Insights from Long-Term Research in Malaysia, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), *Bat Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer New York, pp. 169–185.

Kingston, T., 2010. Research priorities for bat conservation in Southeast Asia: a consensus approach. *Biodivers. Conserv.* 19, 471–484.

Klingbeil, B.T., Willig, M.R., 2009. Guild-specific responses of bats to landscape composition and configuration in fragmented Amazonian rainforest. *J. Appl. Ecol.* 46, 203–213. doi:10.1111/j.1365-2664.2008.01594.x

Kunz, T.H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., Fleming, T.H., 2011. Ecosystem services provided by bats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1223, 1–38. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x

Mayer, J.D., 2000. Geography, ecology and emerging infectious diseases. *Soc. Sci. Med.* 50, 937–952. doi:10.1016/S0277-9536(99)00346-9

Meyer, C.F.J., Fründ, J., Lizano, W.P., Kalko, E.K.V., 2008. Ecological correlates of vulnerability to fragmentation in Neotropical bats. *J. Appl. Ecol.* 45, 381–391. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01389.x

Meyer, C.F.J., Kalko, E.K.V., 2008. Assemblage-level responses of phyllostomid bats to tropical forest fragmentation: land-bridge islands as a model system. *J. Biogeogr.* 35, 1711–1726. doi:10.1111/j.1365-2699.2008.01916.x

Mildenstein, T., Tanshi, I., Racey, P.A., 2016. Exploitation of Bats for Bushmeat and Medicine, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 325–375.

Phommexay, P., Satasook, C., Bates, P., Pearch, M., Bumrungsri, S., 2011. The impact of rubber plantations on the diversity and activity of understorey insectivorous bats in southern Thailand. *Biodivers. Conserv.* 20, 1441–1456. doi:10.1007/s10531-011-0036-x

- Poffenberger, M., 2009. Cambodia's forests and climate change: Mitigating drivers of deforestation. *Nat. Resour. Forum* 33, 285–296. doi:10.1111/j.1477-8947.2009.01249.x
- Pons, J.-M., Cosson, J.-F., 2002. Use of forest fragments by animalivorous bats in French Guiana. *Rev. Décologie Supplément* 117–130.
- Presley, S.J., Willig, M.R., Wunderle, J., Saldanha, L.N., 2008. Effects of reduced-impact logging and forest physiognomy on bat populations of lowland Amazonian forest. *J. Appl. Ecol.* 45, 14–25. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01373.x
- Ripperger, S.P., Tschapka, M., Kalko, E.K., V, Rodriguez-herrera, B., Mayer, F., 2013. Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. *Conserv. Genet.* 14, 925–934. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10592-012-0434-y
- Sampaio, E.M., Kalko, E.K.V., Bernard, E., Rodríguez-Herrera, B., Handley, C.O., 2003. A Biodiversity Assessment of Bats (Chiroptera) in a Tropical Lowland Rainforest of Central Amazonia, Including Methodological and Conservation Considerations. *Stud. Neotropical Fauna Environ.* 38, 17–31. doi:10.1076/snfe.38.1.17.14035
- Sodhi, N.S., Koh, L.P., Brook, B.W., Ng, P.K.L., 2004. Southeast Asian biodiversity: an impending disaster. *Trends Ecol. Evol.* 19, 654–660. doi:10.1016/j.tree.2004.09.006
- Stibig, H.J., Stolle, F., Dennis, R., Feldkötter, C., 2007. Forest Cover Change in Southeast Asia-The Regional Pattern. *JRC Sci. Tech. Rep.* EUR 22896.
- Struebig, M.J., Kingston, T., Petit, E.J., Le Comber, S.C., Zubaid, A., Mohd-Adnan, A., Rossiter, S.J., 2011. Parallel declines in species and genetic diversity in tropical forest fragments. *Ecol. Lett.* 14, 582–590. doi:10.1111/j.1461-0248.2011.01623.x
- Struebig, M.J., Kingston, T., Zubaid, A., Le Comber, S.C., Mohd-Adnan, A., Turner, A., Kelly, J., Bozek, M., Rossiter, S.J., 2009. Conservation importance of limestone karst outcrops for Palaeotropical bats in a fragmented landscape. *Biol. Conserv.* 142, 2089–2096.
- Struebig, M.J., Kingston, T., Zubaid, A., Mohd-Adnan, A., Rossiter, S.J., 2008. Conservation value of forest fragments to Palaeotropical bats. *Biol. Conserv.* 141, 2112–2126.
- Struebig, M.J., Turner, A., 2013. Quantifying the biodiversity value of repeatedly logged rainforests: gradient and comparative approaches from Borneo.
- Thi, S., Furey, N.M., Jurgens, J.A., 2014. Effect of bat guano on the growth of five economically important plant species. *J. Trop. Agric.* 52, 169–173.
- Villard, M.-A., Metzger, J.P., 2014. Beyond the fragmentation debate: a conceptual model to predict when habitat configuration really matters. *J. Appl. Ecol.* 51, 309–318.
- Wildlife, S.C., 2014. Atlas of Cambodia. Maps on socio-economic development and environment. Save Cambodia's Wildlife, Phnom Penh.
- Wong, S., Lau, S., Woo, P., Yuen, K.-Y., 2007. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev. Med. Virol.* 17, 67–91. doi:10.1002/rmv.520

Woodward, A., Hales, S., Litidamu, N., Phillips, D., Martin, J., 2000. Protecting human health in a changing world: the role of social and economic development. Bull. World Health Organ. 78, 1148–1155. doi:10.1590/S0042-96862000000900010

WWF, 2013. Ecosystems in the Greater Mekong: past trends, current status, possible futures, World Wide Fund For Nature, Greater Mekong: Bangkok, Thailand.

Fin de la revue de la littérature

Analysis of environmental characteristics and the detection of coronaviruses and astroviruses in bat populations in Cambodia and Lao PDR.

1. Introduction

South-East Asia (SEA) harbors 20% of the global diversity and four of the world's 25 biodiversity hotspots. SEA is also considered a hotspot for emerging infectious diseases (Jones *et al.*, 2008). The region encompasses demographical and economical development with important environmental modifications, leading to dramatic consequences on landscapes and biodiversity - overexploitation, habitat conversion, destruction and fragmentation (Sodhi *et al.*, 2004). Habitat and biodiversity loss, as well as ecosystem disturbance, lead to increased contacts between wildlife and humans, and have been shown to drive zoonoses emergence (Kingston, 2008). Increased risk of transmission and emergence of zoonotic diseases has been observed in SEA during episodes of pathogenic rodent-borne viruses circulation in human populations (Blasdell *et al.*, 2011, 2016; Duong *et al.* 2016) as well as during outbreaks of Nipah virus infections, and severe acute respiratory syndrome pandemic which both originated from bats (Chua *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006; Field, 2009). Important is that SEA is a land of high bat diversity, habitat to 30% of the known global bat fauna (Kingston, 2010). In this region, bats are often hunted for food and sold in markets or restaurants

(Mildenstein *et al.*, 2016). In Cambodia and Vietnam, bats are bred for guano, used as a plant fertilizer (Thi *et al.*, 2014).

Logging and conversion of forests into agricultural lands, monoculture plantations, and urban areas have impacted the landscape configuration, e.g. the proportion of natural forest and its fragmentation and connectivity between habitats (Flint 1994, Sodhi *et al.*, 2004, Defries *et al.*, 2010). The Greater Mekong Subregion has lost 30% of its forest cover since 1970 (Costenbader *et al.*, 2015). According to upper bond estimates, SEA is predicted to lose 75% of its original forest and 42% of its mammal species by 2100 (Sodhi *et al.*, 2004). The deforestation rates in SEA are the highest in any tropical regions and are expected to lead to the extinction of many bat taxa and modification of distribution areas, which could bring bats even closer to humans (Achard *et al.*, 2002; Sodhi *et al.*, 2004; Stibig *et al.*, 2007).

Bats were discovered as reservoir for the progenitor virus of the coronavirus strain, responsible for the SARS pandemic between 2002 and 2004 (Wang *et al.*, 2006). Coronaviruses belonging to alpha-CoV and beta-CoV, including SARS-like strains of coronavirus have been detected in Asian bat populations (Lacroix *et al.*, 2016a). Several viral families have also been detected, including astroviruses (Lacroix *et al.*, 2016b) henipaviruses or flaviviruses. Other works have shed light on how anthropogenic and environmental changes may impact the dynamic of virus transmission and public health (Calisher *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2015). No study on the impact of the environment on the potential interactions between humans and bats has been performed so far in this region. In this study, we therefore used the dataset established during the survey of coronavirus and astrovirus in bats in Lao PDR and Cambodia (Lacroix *et al.* 2016a, 2016b) to investigate how the virus distribution relates to the environmental parameters.

2. Materials and methods

2.1. Bats collection. Bats were collected from 43 sites in Cambodia and Lao PDR between 2010 and 2013 (Lacroix *et al.*, 2016a, 2016b) (Figure. 1). Samples were taken from bats mostly dedicated to human consumption, in markets, restaurants or directly from hunters. Geographical coordinates of each collection site were recorded using a Global Positioning System (GPS) recorder and the surrounding environment was described based on field observation (*i.e.* market, urban environment, restaurant, village, natural habitat) and on land cover map analysis (see 2.4.). Collection of samples was highly heterogeneous in terms of sites, time period, number of bats, and type of bats. According to IUCN and SEABCRU databases, the bats collected during the project were from 6 of the 10 bat families and 15 of the 44 genera which are thought to be present in these countries. Bats were identified at the genus level by trained biologists. Rectal and oral swabs, as well as feces when available, were stored in viral transport medium solutions. When it was possible, lung specimens were sampled and separately placed in cryotubes. Samples were immediately transferred into liquid nitrogen before being transported to the Institut Pasteur of Cambodia and the National Animal Health Centre where they were stored at -80°C prior to virus testing.

2.2. Detection of coronavirus and astrovirus. Detection of coronavirus (CoV) and astrovirus (astV) were performed at Institut Pasteur in Cambodia. Viral RNA was extracted from rectal swabs, oral swabs and lung samples separately before testing. The detection was based on broadly reactive reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) assays, following the procedures described previously (Chu *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2010). The detection of coronavirus was performed on RNA extracted from swab samples, while the

detection of astrovirus was performed on lung specimen, feces, oral and rectal swabs (Table 1).

2.3. Environmental indices. Land cover data corresponding to the environment during the study, was obtained from GlobeLand30 service operated by the National Geomatics Center of China (NGCC, 2014). Initial data was produced in 2010 and updated in 2014. Images are from the American Earth observation Satellite (Landsat8). The land cover map showed the main classes of land use, as a synthesis of various material types, *i.e.* their natural attributes and features on earth's surface. Images used for GlobeLand30 classification (GLC30) were multispectral images with a 30-meter resolution. The schemes were merged into six main categories, *i.e.* crop land, forest, grassland, wetland, water bodies and settlement area. Due to the heterogeneous data collection methods on forest types in Lao PDR and Cambodia, as well as the lack of data in some areas, no distinction was made between forest types. In the next steps, clear, mixed, dense or sparse forest were all considered as the forest class. Elevation map was obtained from Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) of the Consortium for Spatial Information (CGIAR-CSI). Most of the bats were sampled on markets or directly in the villagers' houses. They had been hunted in the surrounding environment. Due to road connectivity, the distance between catching and selling points is likely to be less than 20km. Based on the ecology and potential flying distances of the collected bats, we assumed that a 20 km radius around a sampling site should include the original environment of the hunted or trapped bat. In our study, we consider this buffer zone of 20km as the Area Of Interest (AOI). Aiming to describe the landscape composition and configuration in the surroundings of each bat collection site, landscape metrics were calculated within the AOI. These metrics were extracted from the 2010 land cover data (GLC30), using the Patch Analyst extension in Geographical Information Systems (GIS) software ArcMap 10.3.1. More precisely, the

proportion of each land-cover type, the Shannon diversity index (SDI) was calculated. Forest fragmentation indices were calculated using the forest's class: more precisely the patch density of forest (Fg) (*i.e.* density of the forest class within each AOI) and edge density (ED) (*i.e.* density of forest borders divided by the area of forest). Average elevation (E) in each AOI was also extracted.

2.4. Demographical data. Administration data was obtained from the GADM database of Global Administrative Areas (version 2.8, November 2015). Main roads networks in Cambodia and Lao PDR were obtained from Digital Chart of the World (DCW), available on DIVA-GIS online resource (www.diva-gis.org). Only the primary and secondary roads were taken into account, because, contrarily to smaller roads and pathways, they do not evolve much over time. In order to estimate how connected the network is in each AOI, the total length of these roads and the number of intersections between them were measured (Supplementary Figure 1).

2.5. Statistical analysis. To study the variability of the collection sites with regard to their environmental profile, we carried out a principal components analysis (PCA), using the software R version 3.3.0 (www.r-project.org), using *ade4*, *FactoMineR* and *MASS* packages (Chessel *et al.*, 2004; Lê *et al.*, 2008; Venables and Ripley, 2003) and Statistica v.12. For visualization purpose, biplots in the *factoextra* package was used (Kassambara, 2015). PCA analysis was preceded with normalization of the data since they were expressed in different scales. Due to differences in bats counts in the sampling points, bats genera infected by virus and presence of virus were treated as a unit. This means that some points (e.g. point 26) were multiplied for the PCA purposes by the count of the bats species or virus presence variation.

This might influence the PCA results but it was needed for the purposes of discrimination between classes. Five sets of supplementary variables were investigated, i.e. (i) collected bats in each AOI and two datasets of astrovirus (ii) and coronavirus (iii) detection results for each bat genus in each collection site, and last datasets corresponding to the coronavirus groups (iv) and astrovirus groups (v) which were detected in each AOI (Table 2). Supplementary variables are not used for the determination of the principal components. Their coordinates are predicted using the information provided by the performed PCA on active variables. As shown, by the previous studies (Lacroix *et al.*, 2016a, 2016b), the number of bat genera which tested positive for viruses are lower than the total number of collected bat genera (Table 2).

3. Results

3.1. Description of the study area. The study was carried out in Cambodia and Lao PDR. Their surface are around 181 000 and 237 000 square kilometers (sq. km) respectively, sharing 150 km of border. They are divided in 25 and 16 official provinces (Sisouphanthong and Taillard, 2000; Wildlife, 2014). Total population is around 14,4 and 6,26 millions of people, with a density of 81.4 and 27.1 people per sq. km at the time of the study (2010) in Cambodia and Lao PDR respectively (FAO and World Bank, 2016b). Their economical development has suffered from civil wars, and both countries represent some of the poorest countries in the world (World Development Indicators, 2016). The rural populations accounted for 80.2 and 66.9 of the total population in Cambodia and Lao PDR in 2010 (FAO and World Bank, 2016c). Agriculture represented a significant part of the of the national Gross Domestic product (GDP) (36% and 32.7% respectively) (FAO and World Bank, 2016a). Like countries in SEA, Cambodia and Lao PDR have a tropical climate and experience rainy season from May to October, and dry season from November to April. The thickly forested Lao PDR landscape consists in rugged mountains (up to 2800m) surrounded by plains and plateaus. The Mekong River represents the "lifeline" of the country, and is the major economic corridor (Sisouphanthong and Taillard, 2000). In Cambodia, the landscape is characterized by a low-lying central plain including the Tonle Sap Lake and the upper areas of the Mekong River delta dominated by irrigated cultures. During the rainy these territories are flooded (Wildlife, 2014; ODC, 2015). They surrounded by uplands and low mountains, and thinly forested and transitional plains (200m above sea level) (Wildlife, 2014a). The most severe environmental issue in both countries is likely to be deforestation. Cambodia and Lao PDR experienced an important forest loss and fragmentation: 22% and 24% of their forest

cover disappeared between 1973 and 2009 (WWF, 2013). In 2010, the forest covered 57.2% and 77.2 % of Cambodia and Lao PDR respectively (FAO and World Bank, 2016).

3.2. Sampling sites. A total of 1876 animals were sampled in 14 districts in Cambodia (n=1247 bats) and 13 districts in Lao PDR (n=629 bats) at the interface between humans and bats. For animals collected in the environment and in guano farms, the exact environmental description of the sampling location is available. For samples collected in restaurants and meat shops or from hunters, the exact original location of animals remained unknown but they were hunted for market trade from near the location where the animal specimens were sold: mostly from areas at the border of deep forests, mixed agricultural zones with sparse forests or protected forest areas, close to water surfaces or in limestone karsts areas with mountain forests (Figure 1). Almost 70% of specimens collected in Cambodia were from 4 of the 13 districts at sampling sites located in Choam Khsant, Kean Svay, Muong Russei and Kang Meas. Similarly, almost 75% of specimen sampled in Lao PDR were from 4 of the 13 districts (i.e. Kasi, Mueang Feuang, Vang Vieng and Vieng Tong). Landscape parameters for each AOI were described primarily by 12 variables: forest cover, water cover, settlements cover, cropland cover, wetland cover, grassland cover, elevation, Shannon index, Simpson index, Fragmentation index, edge density and connectivity index. Shannon index, Simpson index, Fragmentation index and edge density were considered to describe the spatial characteristics of the forest in each AOI. Shannon index, Simpson index, fragmentation index and edge density were not independent and therefore only the Shannon index and the fragmentation index were retained as independent parameters describing the forest characteristics. AOI landscapes were thus described by 9 statistically independent parameters: i.e. water cover, settlements cover, cropland cover, wetland cover, grassland cover, elevation, forest Shannon index, forest fragmentation index and connectivity index. Hierarchical analysis based on these

9 parameters resulted in 6 clusters of landscape parameterization as a cluster tree (Figure 2). The number of AOI within each cluster was either 6 (clusters A, C, D), 7 (cluster E) or 9 (clusters B, F) (Figure 2). The main weight for cluster characterization was borne by grass cover, cropland, Shannon index, fragmentation index and connectivity index. Cluster A included 6 AOI, i.e. medium and high elevation, forest percentage ca. 70-80%, low fragmentation, low water and wetland percentage and high connectivity index (2,5-2,9). Only one AOI (38) was negative for viruses. Sites 39, 40, 41, 42 and 43 were positive for coronavirus while only two sites (40 and 43) were positive for astrovirus. Cluster B comprised 9 AOI, but only four were positive for at least one virus (33, 35, 36). When compared to cluster A, the forest cover was higher (80-95%), the Shannon index was higher and the human settlements cover was small or not detected in a 30x30 m resolution, which means that villages were small and spread within the space analyzed. Both clusters were located exclusively in Lao PDR. The Euclidean distance indicated that clusters A and B segregated independently from the other 4 clusters. They were characterized by low cultivated land cover, low human settlement cover and a high Shannon index. Clusters C, D, E and F corresponded to AOI located in Cambodia. The cluster pairs C&D and E&F were the closest and most similar. Cluster C included 6 AOI, but only two (11, 12) were only coronavirus positive while no astrovirus was detected. Landscape composition displayed 75 to 92% of forest cover, 1,5 to 2% of grass cover and in general similar elevation (300 m above sea level). The connectivity index was high, and human settlement cover was less than 0.25 %, for both positive AOI. The human settlements cover was “0” meaning that villages were small and spread. Cluster D comprised 6 AOI (1-6), present in general cultivated landscape, with high cropland cover and one of the highest settlement cover (7,2% for AOI 2). Only 3 AOI (1, 2, 3) were detected as viruses positive, for astrovirus only in AOI 1 with high cover of wetlands and one of the highest cover by croplands. Statistically, AOI 1&2 in cluster D were

the most similar among all AOI (Figure 2). Cluster E covered 7 AOI (22-27) dominated by forest (85-98%), with the lowest connectivity index, one of the lowest forest fragmentation index and limited cultivated and grassland areas. The Shannon index was also among the lowest. Cluster E represented wilderness parts of Cambodia. Cluster E also displayed the highest virus richness associated with forest cover, i.e. 8 coronavirus and 9 astrovirus. The last cluster, F, encompassed 9 AOI (13-21) with 6 positive for viruses (13-15, 17, 19, 21). All AOI displayed a majority of cultivated land, but with patches of forest, and the highest connectivity index and wetland cover. The human settlement cover was rather low (0,1-3,5%) indicating that villages were located in groups. Cluster F also comprised the highest rate of coronavirus detection (37, including 28 α CoV_1 in AOI 14) and astrovirus (37 Bat_AstV, located only in two AOI: 13&14). Distances indicated that clusters E and F were the most divergent (Fig. 2).

3.3. Landscape topology of the AOI positive for coronavirus and astrovirus. Two PCA were performed with 9 active independent variables, i.e. water cover, settlements cover, cropland cover, wetland cover, grassland cover, elevation, forest Shannon index (SDI), forest fragmentation index and connectivity index (Figure 3). One PCA was associated with the coronavirus-positive bats (Figure 3a) and the second one with astrovirus-positive bats (Figure 3b). Owing to the fact that locations were coronavirus-positive bats and astroviruses-positive bats were the same only in 7 cases out of 43, the PCAs relating to coronavirus and to astrovirus differ slightly even though they were established only with environmental parameters, the values associated with these parameters being slightly different. With respect to the coronavirus-positive bats (Figure 3a), the first two axes accounted for 76.1% of the total variability. The first axis of the PCA (PC1) accounted for 46.1% of the total variability. The contributions of the environmental variables to the construction of this axis were the

highest for elevation, SDI and grassland which were correlated on the negative side and connectivity, forest fragmentation, cropland cover, water cover, wetland cover and settlement cover which were distributed on the positive side (Figure 3a). The principal dimension of variability of the PCA opposed anthropogenic transformed lands on the positive side to more natural environments (*i.e.* forest, higher elevation areas and grassland areas, with low fragmentation) on the negative side (Figure 3a). The second component of the PCA (PC2) accounted for 30% of the total variability. Fragmentation index, settlement cover and connectivity index were close to the axis and did not participate to the topology of the PCA. Grassland cover, water cover, wetland cover, elevation and cropland cover participated the most to structure of the PCA on the negative side. SDI located on the positive side with a more limited weight (Figure 3a). When considering the PCA representing the astrovirus-positive AOI, contributions were slightly different (Figure 3b). The first two axes contributed for a total of 93.09% with axis 1 representing 53.89% of the dispersion and axis 2 representing 39.2%. The distribution with respect to axis 2 was not affected and remained the same as for coronavirus-positive AOI describe in Figure 3a. The distribution with respect to axis 1 was however slightly affected (Figure 3b). SDI moved to the negative side but very close to axis 1 and therefore did not bear any weight in the analysis. Cropland cover remained in the negative side but move closer to axis 1. Settlements cover, connectivity index and fragmentation index moved to the positive side to be moderately distant from the axis and gaining thus in representativeness (Figure 3b).

3.4. Correlation of coronavirus and astrovirus with environmental parameters. The betacoronavirus $\beta\text{CoV_D3}$ and $\beta\text{CoV_D4}$ were strongly associated with natural, non anthropized habitats and in particular with grassland and higher elevation (Figure 3a). The betacoronavirus groups $\beta\text{CoV_D2}$ and to a lower extent $\beta\text{CoV_D1}$ and $\beta\text{CoV_C}$ seemed to be

more correlated with the forest density gradient, β CoV-D2 being the most influenced by higher forest density (Figure 3a). The alphacoronavirus α CoV_1 and α CoV_2 were strongly associated to anthropic environments and wetlands whereas α CoV_4 was in contrary slightly more associated with more natural habitats (Figure 3b). The astroviruses also displayed a clear differential distribution depending upon environmental parameters. The Ung_AstV population was strongly associated to natural environments, in particular Grassland and higher elevation, whereas the Mur_AstV was in contrary strongly associated to an anthropic environment (Figure 3b). The Bat_AstV group was clearly associated to open areas close to water and wetlands (Figure 3b).

3.5. Correlation between bats genera and environmental data. The different bat genera identified in this work displayed a strong correlation with specific environmental parameters (Figure 4). The main two axes of the PCA associating environmental parameters and bat genera represented 54% and 19.9% for axis 1 and axis 2, respectively and for a total of 73.9% of the overall distribution. *Myotis* was strongly correlated with anthropized environments and water/wetlands whereas the distribution of *Scotophilus* was similarly influenced by forest fragmentation, water and anthropized environments. Conversely, *Hipposideros*, *Eonicteris*, *Ia* and *Rhinolophus* were correlated with more natural habitat of dense forest and grassland at higher elevation. This correlation was stronger for the former two (Figure 4). The genus *Rousettus* was closed to the center, indicating that the distribution of this genus was not strongly and specifically influenced by any of the parameters (Figure 4). Interestingly, *Megaderma* and *Taphozous* were strongly opposed to any of the environmental parameters analyzed indicating that their distribution is influenced by a distinct parameter not considered in this work (Figure 4).

4. Discussion

The main contribution of this work is the demonstration that there is a clear distribution of bat-borne viruses depending upon environmental factors. Differential environmental factor plays a role on the distribution and presence of bat genera and therefore on the viruses they host. For example, the Lesser Asian bat genus (*Scotophilus*) show correlation with the anthropogenic, fragmented environments, close to water areas. The Mouse-eared bat genus (genus *Myotis*) also tend to be collected in anthropogenic areas, close to lake or rivers. These observations are in accordance with their biology and ecology: *Myotis* and *Scotophilus* can adapt to many habitats but settle preferentially in anthropogenic habitats, in old buildings or crevasses. They rely on water bodies, which attract prey for these insectivorous bats (Bates *et al.*, 2008b; Rosell-Ambal *et al.*, 2008). *Scotophilus* bats are also bred for their guano, which explains their reliance on anthropogenic systems (Thi *et al.*, 2014). The results concerning the genera *Hipposideros*, *Macroglossus* and *Rhinolophus*, found mostly in environments with forest areas mixed with other categories of land use, were also in accordance with their biology (Bates *et al.*, 2008a; Hutson *et al.*, 2008; Walston *et al.*, 2008).

As a consequence, the two coronavirus groups $\alpha\text{CoV_1}$ and $\alpha\text{CoV_2}$ which were detected specifically in *Scotophilus* and *Myotis*, respectively (Lacroix *et al.*, 2016a), showed the same trend, i.e. a high correlation with anthropogenic environment. Fruit and forest-dependant bat genera testing positive for the viruses (*Rousettus*, *Eonycteris*) were correlated with the environment, mostly consisting of densely forested areas with a higher elevation. The betacoronavirus clusters $\beta\text{CoV_D3}$ and $\beta\text{CoV_D4}$ which were found mostly in bats from the

genera *Rousettus* and *Eonycteris* were also correlated with the same type of environment. Finding the presence of coronavirus groups which are specific to a genus of bats, in similar environment types shows that the distribution of viruses is likely to follow the distribution of their hosts.

A particular attention has to be paid to the groups α CoV_2 and β CoV_C. These groups are composed by strains that are highly pathogenic for pigs and humans respectively. The group α CoV_2 is the strain of coronavirus responsible for the porcine epidemic diarrhea, which threatens pig farming activities around the world (Song *et al.*, 2015; Lacroix *et al.*, 2016a). The group β CoV_C comprises also the zoonotic strain of coronavirus responsible for the Middle East Respiratory Syndrome (MERS) (Omrani *et al.*, 2015). In our study, the groups α CoV_2 and β CoV_C seems to be linked to anthropogenic habitats. This is in accordance with the presence of their respective hosts (*Myotis* and *Pipistrellus* respectively) in the same kind of environment.

With respect to astrovirus, the presence of irrigated cultures and a high richness of bat genera in the environment were correlated with the presence of astrovirus in bats. This could be explained by the fact that irrigated cultures provide important insect biomass and food resources for insectivorous bat populations, (Kunz and Fenton, 2005). Bat genera richness was positively correlated with the probability of astrovirus infection. This is in accordance with previous results showing that viral richness in bats is correlated with species richness (Turmelle and Olival, 2009). With a greater bat diversity in an area, the probability of contacts between bats from different genera occupying the same environment increases and it may enable transmission of viruses. Furthermore, an environment including human presence and a high diversity of land types, seems associated to a lower probability of finding astroviruses in the bat population. This could be explained by the fact that most bats are sensitive to habitat transformation and disturbance. Such a type of environment might not

attract them, leading to a lower probability to find viruses in the environment. As an example, in Australia, bat species from the genus *Myotis* and *Rhinolophus*, were found to be highly sensitive to urbanization (Threlfall *et al.*, 2012). Nevertheless, it has also been shown by several studies that each bat species differs in their response to urbanization (Altringham and Kerth, 2016; Jung and Threlfall, 2016; Voigt and Kingston, 2016). This highlights the necessity to better understand the ecology of each bat species, especially in the context of changing environments, such as in SEA.

Fragmentation of the habitat has been reported as a key factor in species development. The distribution pattern of bat population has been found to also impact the viral richness of the host (Henle *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2008; Gay *et al.*, 2014). The fragmentation of bat populations was linked to a decrease in viral species richness (Gay *et al.*, 2014). However, this work indicates that if fragmentation is an important parameter, it is not sufficient by itself to explain the distribution observed. The fragmentation index must be considered jointly with the SDI density index to yield a picture accurate enough. In this work, combining these parameters allowed us to clearly associate certain group of viruses to given environments and this is to our knowledge the first time this is achieved in South East Asia and in particular in Cambodia and Laos. This correlation is a direct consequence of the association between bats hosting these viruses and specific environments and is leading to different, hence complementary directions. From an ecological standpoint, the association of certain bat genera with certain environmental patterns can help determining the species which could be at risk in the future due to deforestation, urbanization, environmental change, extension of agricultural land or climate change. There is here a way to identify in priority, bat genera and species for conservation. This work should be accompanied by a modeling of the evolution of the environment over the next decades in order to assess and predict which part of the current

biodiversity may expand and which part may be at risk. There is here a tool for conservation management to be developed.

From a methodological standpoint, the analytic approach proposed in this work allowed us to go around a recurrent problem and dilemma encountered when working on protected potential reservoirs of human pathogens. When sampling bats, or other protected animals hosting potential human pathogens, one is facing a difficult choice which is on one hand to do a strong longitudinal and extensive sampling and surveillance in order to identify the risk of emerging human diseases and threats for human health. Such action will require the capture and euthanasia of many animals. This will in turn infringe the protection act of these animals. Such a large sampling is not possible because of the status of protected species attached to the reservoir. On another hand, avoiding the sampling of protected reservoirs for the sake of conservation and thus avoiding early detection and risk assessment, is putting human populations at risk and contrary to any public health policy. The approach proposed in this work allowed us to consider both aspects at once. The limited sample size and limited quality of the bat material, is a direct consequence of their status of protected species which we respected and enforced in this work. One of the consequences was the difficulty to reach the level of species identification but this could be easily achieved in the future by implementing procedures integrating molecular typing of bats. Another potentially biasing aspect is the estimated distance of the real origin of the sampled bat (20km) was based on an assumption. This could have been underestimated or overestimated for some collection sites. This could also introduce a bias, as the biology of each bat genus is likely to present their own specificities in terms of migrations, flying distance and how they invest their environments (flights during days or nights, occurrences of flights for food research, etc.) (Smith *et al.*, 2011). Thus, these aspects can also impact on the contacts with humans and should be further investigated in order to fit data to the specificity of each bat genus.

However, despite this limitation, the statistical approach implemented in this work allowed us to obtain the information needed on association with virus and environment. This can help designing prospective scenarios based on the expected evolution of landscape.

This brings us to the last aspect which is the possibility to model and develop scenarios of risk management. The prediction of landscape modification, climate change and anthropized actions (urbanization, roads, development of croplands, animal husbandry, etc.) is made possible by economical planning while survey can be achieved by GIS analysis. The association between environmental patterns and groups of virus described in this work will therefore permit to develop a topology of situations at risk depending of the virus involved and scenarios of evolution of the risk of contact and of emergence in the different situations which could arise. Protective actions could therefore be proposed to reduce this risk and block the evolution and development of hazardous contexts.

This work is a preliminary step and deeper analyses and modeling must be implemented, but it nevertheless provides opportunities for developing prospective approaches capable of managing together the protection of bats and wildlife while protecting human populations from potentially devastating emerging bat-borne viral diseases.

5. References

- Altringham, J., Kerth, G., 2016. Bats and Roads, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 35–62.
- Amman, B.R., Carroll, S.A., Reed, Z.D., Sealy, T.K., Balinandi, S., Swanepoel, R., Kemp, A., Erickson, B.R., Comer, J.A., Campbell, S., Cannon, D.L., Khristova, M.L., Atimnedi, P., Paddock, C.D., Crockett, R.J.K., Flietstra, T.D., Warfield, K.L., Unfer, R., Katongole-Mbidde, E., Downing, R., Tappero, J.W., Zaki, S.R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., Towner, J.S., 2012. Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002877. doi:10.1371/journal.ppat.1002877
- Bates, P., Bumrungsri, S., Francis, C., Csorba, G., 2008a. *Hipposideros armiger* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species 2008 ET10110A3162617. URL <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T10110A3162617> (accessed 9.21.16).
- Bates, P., Kingston, T., Francis, C., Rosell-Ambal, G., Heaney, L., Gonzales, J.C., Molur, S., Srinivasulu, C., 2008b. *Scotophilus kuhlii* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species 2008 ET20068A9142479. URL <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T20068A9142479> (accessed 9.21.16).
- Bordes, F., Morand, S., Ricardo, G., 2008. Bat fly species richness in Neotropical bats: correlations with host ecology and host brain. *Oecologia* 1, 109–116.
- Chessel, D., Dufour, A.-B., Thioulouse, J., 2004. The ade4 package - I : One-table methods. *R News* 4, 5–10.
- Chheang, S., Bates, P.J., Boughey, K., Csorba, G., Hayes, B., Ith, S., Mould, A., Phauk, S., Furey, N.M., 2013. Further new country records of four bat species (Chiroptera) from Cambodia and a call for information. *Cambodian J. Nat. Hist.* 2, 73–82.
- Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2008. Novel Astroviruses in Insectivorous Bats. *J. Virol.* 82, 9107–9114. doi:10.1128/JVI.00857-08
- Drexler, J.F., Corman, V.M., Wegner, T., Tateno, A.F., Zerbinati, R.M., Gloza-Rausch, F., Seebens, A., Müller, M.A., Drosten, C., 2011. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 449–456. doi:10.3201/eid1703.100526
- FAO, World Bank, 2016. Forest area (% of land area) | Data [WWW Document]. URL <http://data.worldbank.org/indicator/AG.LND.FRST.ZS?view=chart> (accessed 10.5.16).
- Food and Agriculture Organization, World Bank, 2016a. Agriculture, value added (% of GDP) | Data [WWW Document]. URL <http://data.worldbank.org/indicator/NV.AGR.TOTL.ZS?view=chart> (accessed 10.5.16).
- Food and Agriculture Organization, World Bank, 2016b. Food and Agriculture Organization and World Bank population estimates. [WWW Document]. URL <http://data.worldbank.org/indicator/EN.POP.DNST> (accessed 10.5.16).

- Food and Agriculture Organization, World Bank, 2016c. Rural population (% of total population) | Data [WWW Document]. World Bank. URL <http://data.worldbank.org/indicator/SP.RUR.TOTL.ZS?view=chart>
- Fortin, M.-J., Keitt, T.H., Maurer, B.A., Taper, M.L., Kaufman, D.M., Blackburn, T.M., 2005. Species' Geographic Ranges and Distributional Limits: Pattern Analysis and Statistical Issues. *Oikos* 7–17.
- Gay, N., Olival, K.J., Bumrungsri, S., Siriaronrat, B., Bourgarel, M., Morand, S., 2014. Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: Fragmentation of area distribution matters. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 161–170. doi:10.1016/j.ijppaw.2014.06.003
- George, D.B., Webb, C.T., Farnsworth, M.L., O'Shea, T.J., Bowen, R.A., Smith, D.L., Stanley, T.R., Ellison, L.E., Rupprecht, C.E., 2011. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10208–10213. doi:10.1073/pnas.1010875108
- Henle, K., Davies, K.F., Kleyer, M., Margules, C., Settele, J., 2004. Predictors of Species Sensitivity to Fragmentation. *Biodivers. Conserv.* 13, 207–251. doi:10.1023/B:BIOC.00000004319.91643.9e
- Hutson, A.M., Suyanto, A., Kingston, T., Bates, P., Francis, C., Molur, S., Srinivasulu, C., 2008. *Macroglossus sobrinus* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species 2008 ET12595A3363666. URL <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T12595A3363666> (accessed 9.21.16).
- IUCN, 2016. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2.1 <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 August 2016 [WWW Document]. UICN. URL <http://www.iucn.org/fr> (accessed 8.11.16).
- Jung, K., Threlfall, C.G., 2016. Urbanisation and Its Effects on Bats—A Global Meta-Analysis, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 13–33.
- Kassambara, A., 2015. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. R Package Version 1.
- Kingston, T., 2013. Response of Bat Diversity to Forest Disturbance in Southeast Asia: Insights from Long-Term Research in Malaysia, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), *Bat Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer New York, pp. 169–185.
- Kunz, T.H., Fenton, M.B., 2005. *Bat Ecology*. University of Chicago Press.
- Lacroix, A 2016 a : reference to the article submitted (chapter 2): " Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia" to be published soon
- Lacroix, A 2016 b reference to the article submitted (chapter 3): " Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia", to be published soon
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25.

- Meyer, C.F.J., Fründ, J., Lizano, W.P., Kalko, E.K.V., 2008. Ecological correlates of vulnerability to fragmentation in Neotropical bats. *J. Appl. Ecol.* 45, 381–391. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01389.x
- Meyer, C.F.J., Struebig, M.J., Willig, M.R., 2016. Responses of Tropical Bats to Habitat Fragmentation, Logging, and Deforestation, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 63–103.
- Mildenstein, T., Tanshi, I., Racey, P.A., 2016. Exploitation of Bats for Bushmeat and Medicine, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 325–375.
- Omrani, A.S., Al-Tawfiq, J.A., Memish, Z.A., 2015. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): animal to human interaction. *Pathog. Glob. Health* 109, 354–362. doi:10.1080/20477724.2015.1122852
- Rosell-Ambal, G., tabaranza, B., Heaney, L., Gonzales, J.C., Molur, S., Srinivasulu, C., 2008. *Myotis horsfieldii* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species 2008 ET14166A4413659. URL <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T14166A4413659> (accessed 9.21.16).
- Sisouphanthong, B., Taillard, C., 2000. *Atlas of Laos: The spatial structures of economic and social development of the Lao People's Democratic Republic*. St. Martin's Press.
- Smith, A.C., Fahrig, L., Francis, C.M., 2011. Landscape size affects the relative importance of habitat amount, habitat fragmentation, and matrix quality on forest birds. *Ecography* 34, 103–113. doi:10.1111/j.1600-0587.2010.06201.x
- Sodhi, N.S., Koh, L.P., Brook, B.W., Ng, P.K.L., 2004. Southeast Asian biodiversity: an impending disaster. *Trends Ecol. Evol.* 19, 654–660. doi:10.1016/j.tree.2004.09.006
- Song, D., Moon, H., Kang, B., 2015. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 4, 166–176. doi:10.7774/cevr.2015.4.2.166
- Thi, S., Furey, N.M., Jurgens, J.A., 2014. Effect of bat guano on the growth of five economically important plant species. *J. Trop. Agric.* 52, 169–173.
- Thomas, N.M., Duckworth, J.W., Douangboubpha, B., Williams, M., Francis, C.M., 2013. A checklist of bats (Mammalia: Chiroptera) from Lao PDR. *Acta Chiropterologica* 15, 193–260.
- Threlfall, C.G., Law, B., Banks, P.B., 2012. Sensitivity of insectivorous bats to urbanization: Implications for suburban conservation planning. *Biol. Conserv.* 146, 41–52. doi:10.1016/j.biocon.2011.11.026
- Turmelle, A.S., Olival, K.J., 2009. Correlates of Viral Richness in Bats (Order Chiroptera). *Ecohealth* 6, 522–539.
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2003. *Modern Applied Statistics with S*. JSTOR.
- Voigt, C., Kingston, T., 2016. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing.

- Wacharapluesadee, S., Boongird, K., Wanghongsa, S., Ratanasetyuth, N., Supavonwong, P., Saengsen, D., Gongal, G.N., Hemachudha, T., 2010. A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in *Pteropus lylei* bats in Thailand: evidence for seasonal preference in disease transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 10, 183–190.
doi:10.1089/vbz.2008.0105
- Walston, J., Kingston, T., Hutson, A.M., 2008. *Rhinolophus affinis* [WWW Document]. IUCN Red List Threat. Species 2008 ET19522A8952553. URL The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T19522A8952553 (accessed 9.21.16).
- Watanabe, S., Masangkay, J.S., Nagata, N., Morikawa, S., Mizutani, T., Fukushi, S., Alviola, P., Omatsu, T., Ueda, N., Iha, K., Taniguchi, S., Fujii, H., Tsuda, S., Endoh, M., Kato, K., Tohya, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., Akashi, H., 2010. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1217–1223.
doi:10.3201/eid1608.100208
- Wildlife, S.C., 2014. Atlas of Cambodia. Maps on socio-economic development and environment. Save Cambodia's Wildlife, Phnom Penh.
- WWF, 2013. Ecosystems in the Greater Mekong: past trends, current status, possible futures, World Wide Fund For Nature, Greater Mekong: Bangkok, Thailand.
- World Development Indicators, 2016. World Development Indicators: Poverty & Equity [WWW Document]. URL <http://povertydata.worldbank.org/poverty/home/> (accessed 10.5.16).

6. Tables

Table 1. Summary of the detection of astrovirus and coronavirus in bats collected from 43 sites in Lao PDR and Cambodia between 2010 and 2013.

Country	Site	District	No of bat collected	No of bat tested (No of positive)	Bat genus positive	coronavirus strains	No of bat tested (No of positive)	Bat genus positive	astrovirus strains
Cambodia	1	Bakan	72	5(1)	Sco	α CoV-1	72(15)	Sco	Bat astV, group 8 astV
	2	banan	24	24(5)	Cyn, Mgl	β CoV-D1, β CoV-D2, β CoV-D3	24(0)	-	
	3	Choam Khsant	43	43(4)	Cyn	β CoV-D2	43(0)	-	
	4	Choam Khsant	12	12(0)	-		12(0)	-	
	5	Choam Khsant	7	6(0)	-		7(0)	-	
	6	Choam Khsant	11	11(0)	-		11(0)	-	
	7	Choam Khsant	17	17(0)	-		17(0)	-	
	8	Choam Khsant	39	36(0)	-		39(0)	-	
	9	Choam Khsant	1	1(0)	-		1(0)	-	
	10	Choam Khsant	40	39(0)	-		39(0)	-	
	11	Kaev Seima	9	9(1)	Pip	α CoV-1	9(0)	-	Bat astV
	12	Kaev Seima	20	20(1)	Pip	β CoV-C	20(0)	-	
	13	Kampong Chhnang	47	50(2)	Myo	α CoV-2	47(20)	Myo	
	14	Kean Svay	392	392(28)	Sco	α CoV-1	390(17)	Sco	
	15	Moung Russei	112	112(3)	Cyn	β CoV-D3	112(0)	-	
	16	Moung Russei	6	6(0)	-		6(0)	-	
	17	Moung Russei	53	53(2)	Sco	α CoV-1	53(0)	-	
	18	Ou Chum	17	17(0)	-		19(0)	-	
	19	Ou Chum	28	28(2)	Eon, Cyn	β CoV-D1, β CoV-D2	28(0)	-	
	20	Siam Reab	16	16(0)	-		16(0)	-	
	21	Som Lot	7	7(1)	Mgp	β CoV-D2	7(0)	-	
	22	Ta Veaeng	14	14(0)	-		14(0)	-	
	23	Thala Barivat	34	34(1)	Cyn	β CoV-D2	34(2)	Mgd	Bat astV
	24	Thala Barivat	59	59(2)	Rhin, Rs	α CoV-4, β CoV-D2	59(7)	Tph, Hip, Rhin, Rs	

Lao PDR	25	Thala Barivat	9	9(0)	-		9(0)	-	
	26	Veun Sai	12	12(4)	Cyn, Eon	βCoV-D1, βCoV-D2	12(0)	-	
	27	Veun Sai	25	25(4)	Cyn, Eon	βCoV-D1, βCoV-D2	25(0)	-	
	28	Veun Sai	2	2(0)	-		2(0)	-	
	29	Batieng chaleunsouk	3	3(0)	-		3(0)	-	
	30	Bountai	2	2(0)	-		2(0)	-	
	31	Gnommalath	32	32(0)	-		32(1)	Ia	Bat astV
	32	Hinboon	3	3(0)	-		3(0)	-	
	33	Kasi	281	281(6)	Eon, Rs	βCoV-D1, βCoV-D3, βCoV-D4	131(0)	-	
	34	Luang namtha	14	14(0)	-		14(0)	-	
	35	Mahaxai	9	9(0)	-		9(1)	Rs	Bat astV
	36	Meuang Feuang	100	100(3)	Eon, Rs	βCoV-D3	84(9)	Eon, Rs	Bat astV, group7 astV
	37	Meuang Feuang	10	10(0)	-		10(0)	-	
	38	Mueang sing	23	22(0)	-		23(0)	-	
	39	Saravan	74	74(2)	Hip	αCoV-4	33(0)	-	
	40	Vang Vieng	176	176(17)	Eon, Rs	βCoV-D3, βCoV-D4	143(12)	Eon, Rs, Rhin, Hip	Bat astV, group7 astV
	41	Vieng Thong	107	105(0)	-		107(3)	Rhin	Bat astV, group7 astV
	42	Xebangfay	6	6(1)	Rs	βCoV-D3	6(0)	-	
	43	Xebangfay	29	29(3)	Rs	βCoV-D3	29(6)	Rs	Bat astV, group7 astV

Hip: Hipposideros; Eon: Eonycteris; Rs: Rousettus; Rhin: Rhinolophus; Cyn: Cyntopterus; Mgp: Megaerops; Mgl: Macroglossus; Mgd: Megaderma; Pip: Pipistrellus; Myo: Myotis; Sco: Scotophilus

Table 2. Variables used in the statistical analysis (supplementary variables are reported in italics).

Variable type	Variable	name of variable	description	source
Active	Cultiv_land	Cropland	percentage of crop lands in the AOI	GlobeLand30 (NGCC, 2014)
	Wetland	Irrigated culture	percentage of irrigated culture lands in the AOI	GlobeLand30 (NGCC, 2014)
	Grasslanr	Grassland	percentage of grassland in the AOI	GlobeLand30 (NGCC, 2014)
	Water	Water bodies	percentage of water in the AOI	GlobeLand30 (NGCC, 2014)
	Human_set	Human settlement	percentage of human settlement in the AOI	GlobeLand30 (NGCC, 2014)
	SDI	Shannon index	measure of forest patch diversity	GlobeLand30 (NGCC, 2014)
	Frag	Fragmentation	ratio of Perimeter/area of forest patches	GlobeLand30 (NGCC, 2014), (Fortin <i>et al.</i> , 2005)
	Elevation	Elevation	average elevation of the AOI	Consortium for Spatial Information (CGIAR-CSI)
	Connectivity	Road connectivity	density of roads connections for the AOI	Digital Chart of the World, www.diva-gis.org
Supplementary (Set 1)	<i>Eon</i>	<i>Eonycteris</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Cyn</i>	<i>Cyntopterus</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Hip</i>	<i>Hipposideros</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Ia</i>	<i>Ia</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Mgl</i>	<i>Macroglossus</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Mgd</i>	<i>Megaderma</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Mgp</i>	<i>Megaerops</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Myo</i>	<i>Myotis</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Pip</i>	<i>Pipistrellus</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Pt</i>	<i>Pteropus</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Rhn</i>	<i>Rhinolophus</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Rs</i>	<i>Rousettus</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Sco</i>	<i>Scotophilus</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Tph</i>	<i>Taphozous</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
	<i>Tyl</i>	<i>Tylonycteris</i>	bat genus collected in the AOI	(Lacroix at al. 2016a, 2016b)
Supplementary (Set 2)	<i>Hip</i>	<i>Hipposideros</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Eon</i>	<i>Eonycteris</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Rs</i>	<i>Rousettus</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Rhin</i>	<i>Rhinolophus</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Cyn</i>	<i>Cyntopterus</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Mgp</i>	<i>Megaerops</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Mgl</i>	<i>Macroglossus</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Mgd</i>	<i>Megaderma</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)

	<i>Pip</i>	<i>Pipistrellus</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Myo</i>	<i>Myotis</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
	<i>Sco</i>	<i>Scotophilus</i>	bat genus positive for astroviruses	(Lacroix at al. 2016b)
Supplementary (Set 3)	<i>Hip</i>	<i>Hipposideros</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Eon</i>	<i>Eonycteris</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Rs</i>	<i>Rousettus</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Rhin</i>	<i>Rhinolophus</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Cyn</i>	<i>Cyntopterus</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Mgp</i>	<i>Megaerops</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Mgl</i>	<i>Macroglossus</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Mgd</i>	<i>Megaderma</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Pip</i>	<i>Pipistrellus</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Myo</i>	<i>Myotis</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
	<i>Sco</i>	<i>Scotophilus</i>	bat genus positive for coronaviruses	(Lacroix at al. 2016a)
Supplementary (Set 4)	<i>bCoV_D1</i>	<i>beta-coronavirus from the subgroup D1 of the bCoV_D lineage</i>		(Lacroix at al. 2016a)
	<i>bCoV_D2</i>	<i>beta-coronavirus from the subgroup D2 of the bCoV_D lineage</i>		(Lacroix at al. 2016a)
	<i>bCoV_D3</i>	<i>beta-coronavirus from the subgroup D3 of the bCoV_D lineage</i>		(Lacroix at al. 2016a)
	<i>bCoV_D4</i>	<i>beta-coronavirus from the subgroup D4 of the bCoV_D lineage</i>		(Lacroix at al. 2016a)
	<i>bCoV_C</i>	<i>beta-coronavirus from the bCoV_C lineage</i>		(Lacroix at al. 2016a)
	<i>aCoV_1</i>	<i>alpha-coronavirus from the subgroup 1</i>		(Lacroix at al. 2016a)
	<i>aCoV_2</i>	<i>alpha-coronavirus from the subgroup 2</i>		(Lacroix at al. 2016a)
	<i>aCoV_4</i>	<i>alpha-coronavirus from the subgroup 4</i>		(Lacroix at al. 2016a)
Supplementary (Set 5)	Ung_AstV	astroviruses from the group 7, including diverse mammal astV (ungulates, porcupine)		(Lacroix at al. 2016b)
	Mur_AstV	astroviruses from the group 8, including murine astVs		(Lacroix at al. 2016b)
	Bat_AstV	astroviruses from the groups 1, 2, 3, 4, 5, 6, including only bat astVs		(Lacroix at al. 2016b)

7. Figures

Figure 1. Study area



Figure 2

Heriarchical classification of environmental parameters

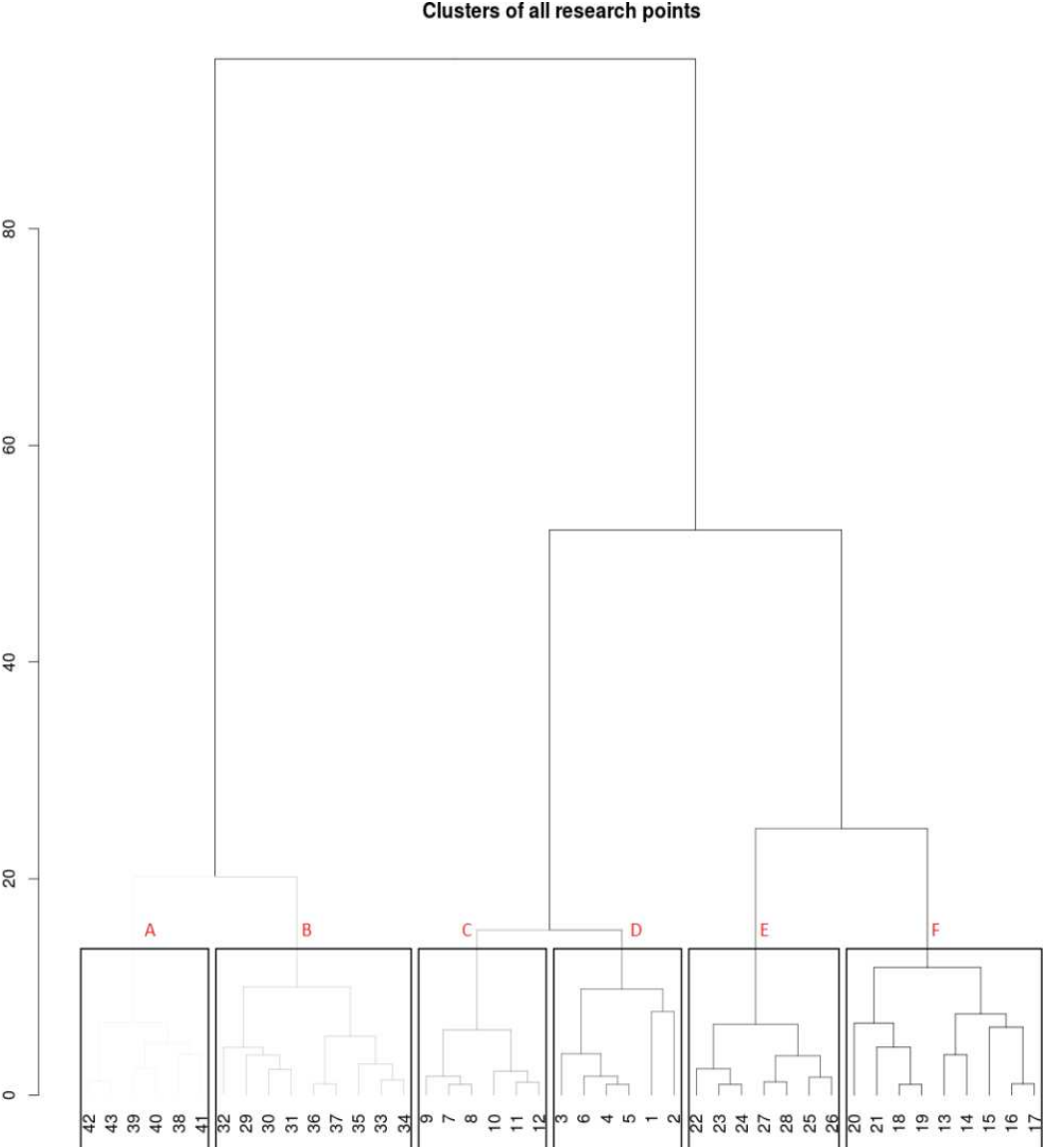
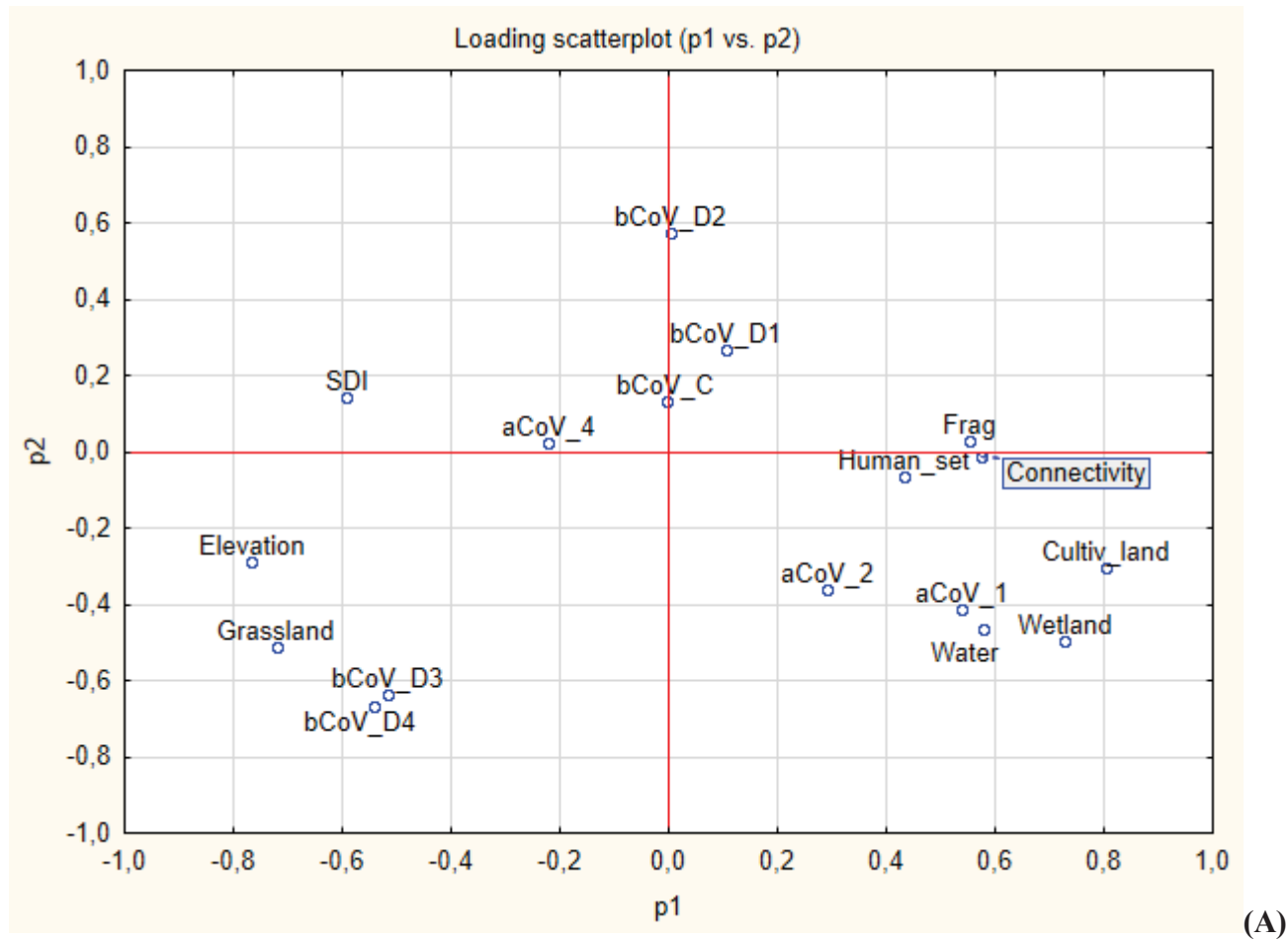


Figure 3

Principal Component Analysis of environmental parameters. (A) PCA in association with coronaviruses and (B) PCA in association with astroviruses



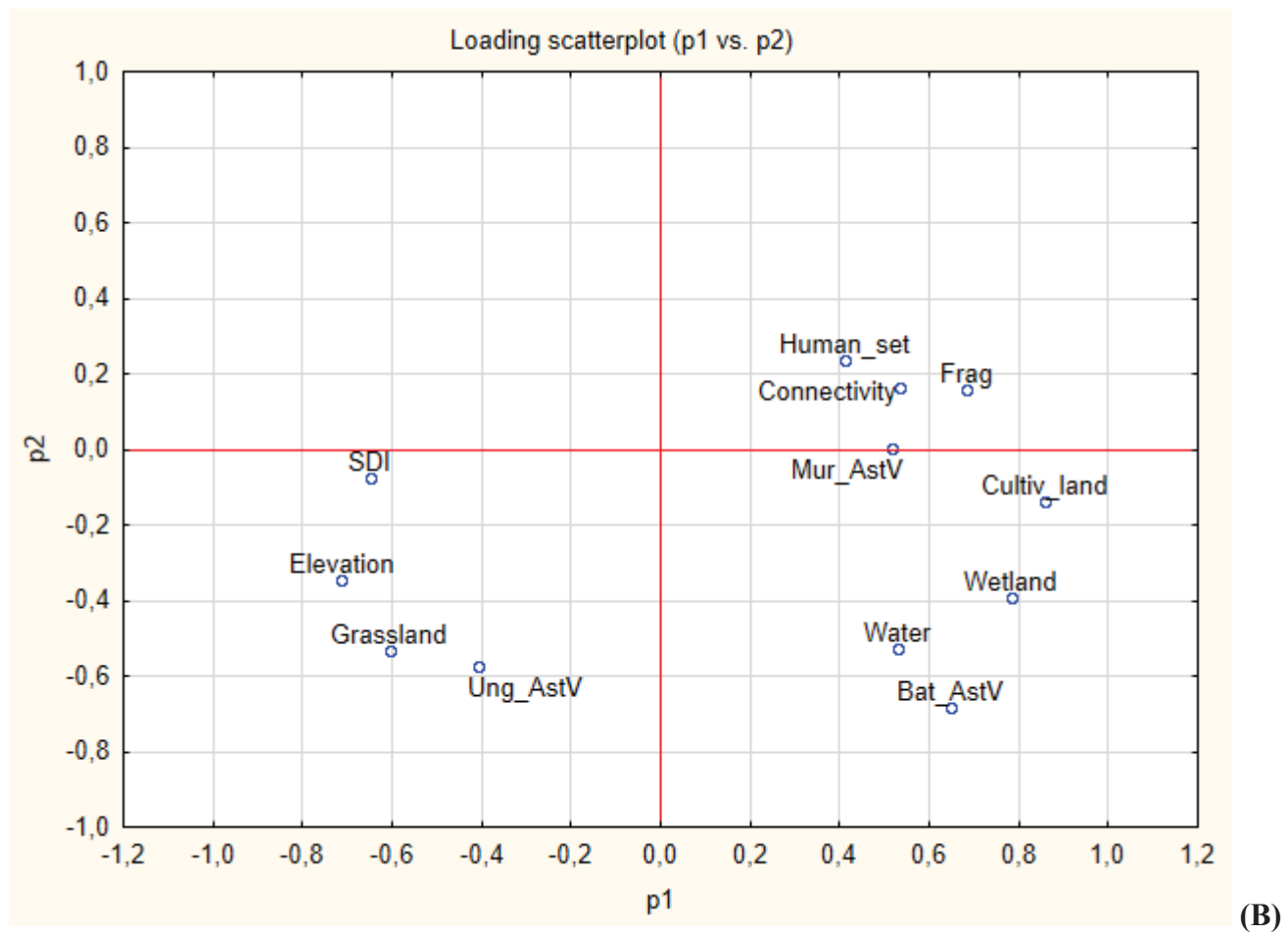
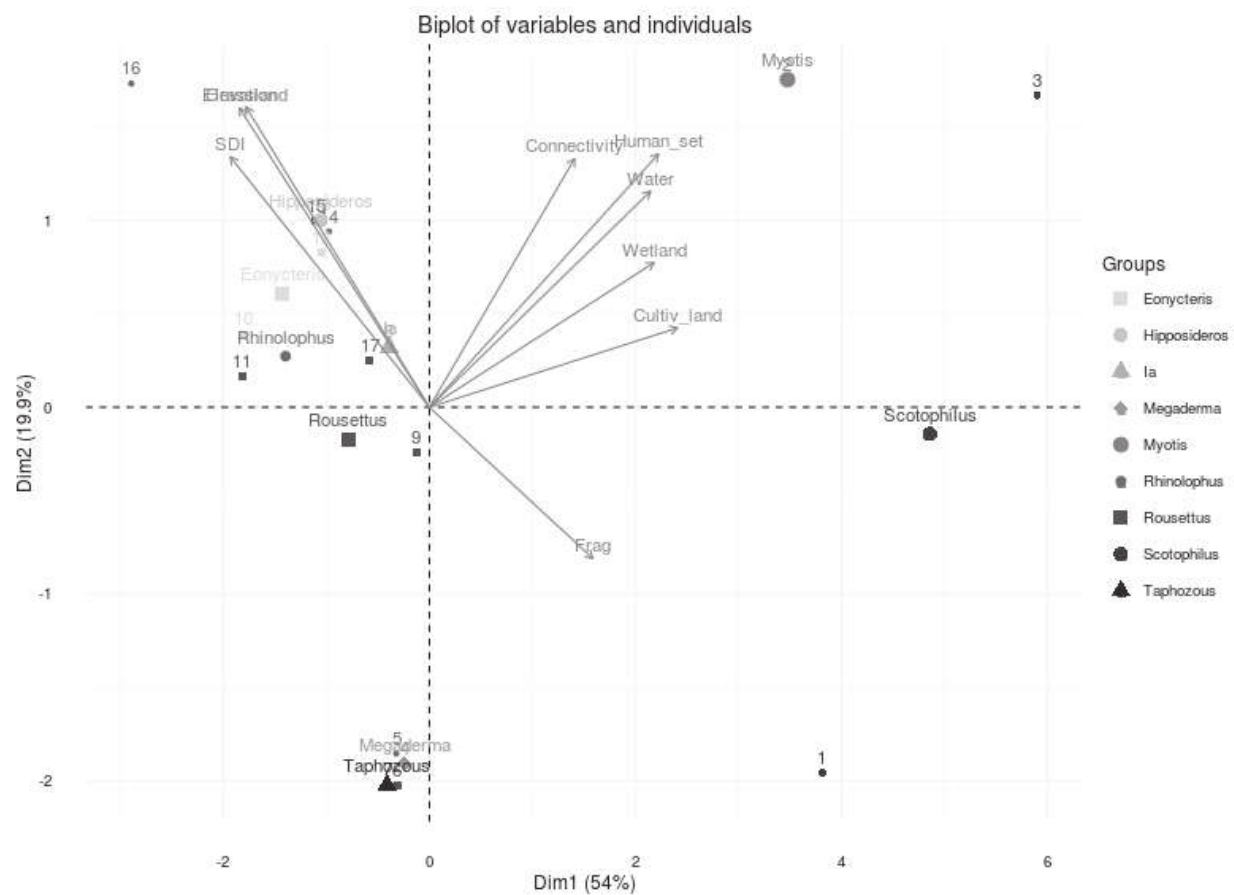
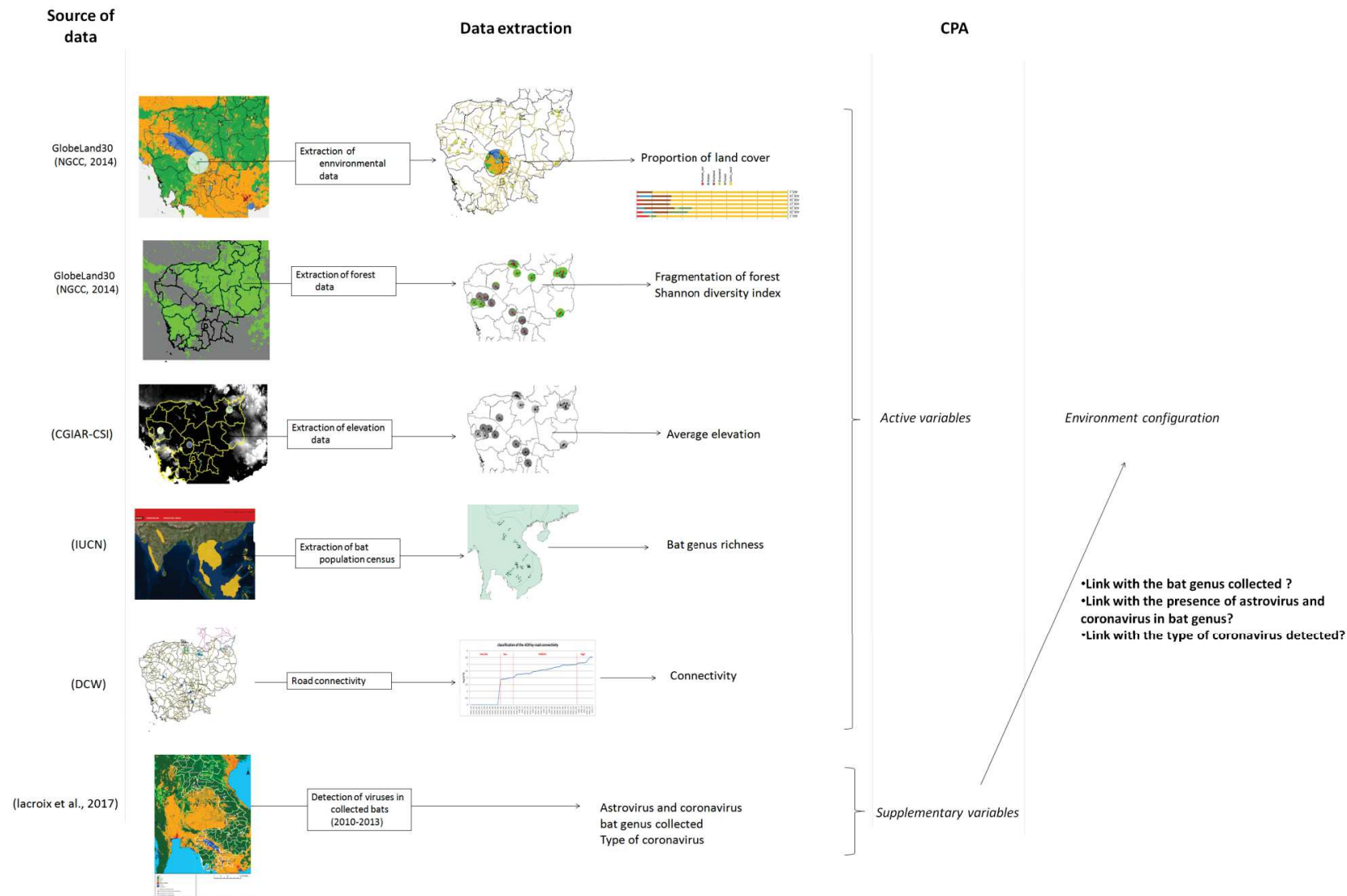


Figure 4

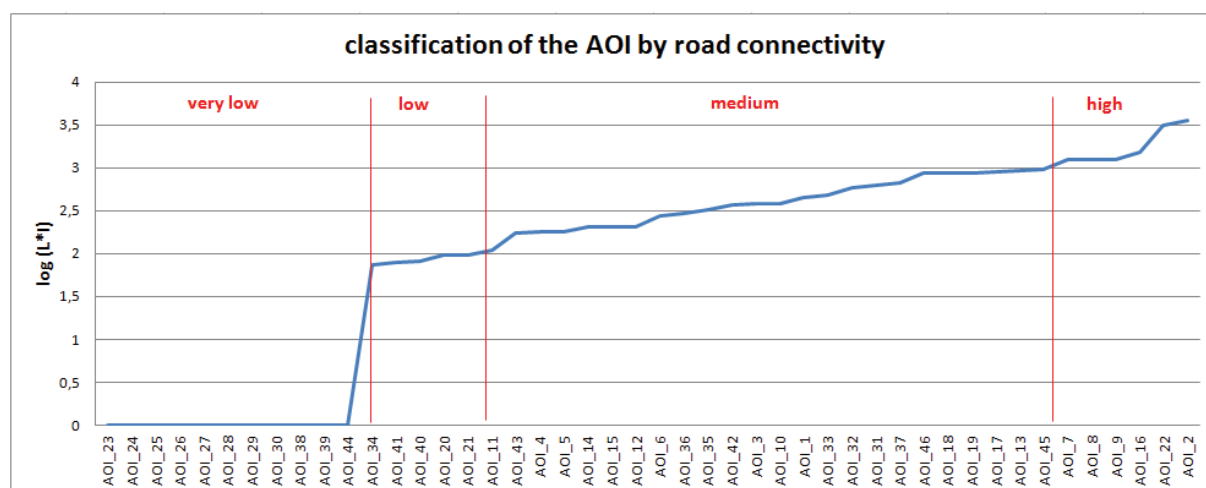
Principal Component Analysis of environmental parameters in association with bat genera



Supplementary Figure 2. Summary of the procedure to analyze the link between environmental parameters and the data related to the detection of astroviruses and coronaviruses in bat population of Lao PDR and Cambodia.



Supplementary figure 1. Calculation of road connectivity index. In each AOI, the total length of the main roads (L) and the number of intersections between them (I) were measured. Logarithm of the product of these measure allows the classification of the connectivity in 4 classes (*i.e.* very low, low, medium, high).



Perspectives et conclusion

L'exploitation de nos données a mis en évidence l'importance de prendre en considération la configuration du paysage sur les populations de chiroptères et leurs virus, et elle semble largement démontrée d'autres situations similaires (Turmelle et Olival, 2009; Gay *et al.*, 2014; Blasdell *et al.*, 2016). L'approche méthodologique, qui a été choisie pour s'adapter à nos données, permettait de résoudre le conflit qui se pose lors de tout projet de santé publique impliquant la recherche de virus potentiellement dangereux pour l'homme mais ayant comme réservoirs des animaux protégés. Ce conflit est, pour répondre au besoin de protection des populations humaines de maladies infectieuses émergentes de devoir réaliser un échantillonnage exhaustif mais destructeur sur des espèces protégées ou alors de ne pas toucher à ces réservoirs protégés et de courir le risque de ne pas pouvoir prévenir une crise sanitaire humaine. Les travaux présentés dans ce chapitre montrent qu'il est possible de trouver une approche méthodologique qui à partir d'un échantillonnage insuffisant et faiblement représentatif permet de déterminer des associations spécifiques entre virus et environnement et donc d'ouvrir la porte au développement de scénarios de gestion de risque. Ce travail de commencer à répondre à la question suivante : "est-ce que certains paramètres environnementaux permettraient de mieux prédire la présence potentielle des virus chez les chiroptères?".

Ben entendu certains aspects sont à améliorer à la lumière de l'expérience acquise. Nous pouvons citer quelques aspects à améliorer dans l'optique d'une analyse plus adaptée à notre question et fondée sur un échantillonnage plus pertinent :

(i) L'échantillonnage était très hétérogène entre les sites de collecte aussi bien en termes de nombre que de diversité de chiroptères échantillonnés. Dans notre cas, les données sur le taux

d'infection ont dépendu de la quantité d'animaux collectés dans chaque site et représentent difficilement la prévalence réelle chez ces chiroptères. A l'avenir, il serait plus judicieux d'avoir une quantité similaire et assez conséquente d'individus collectés dans chaque site, quitte à diminuer le nombre de sites de collecte.

(ii) Le facteur temps n'a pas été pris en compte dans notre analyse. Si l'étude s'est faite sur 3 années, les trop grandes hétérogénéités dans les collectes n'ont pas permis d'inclure cette variable dans l'analyse. Dans la mesure du possible, ce facteur doit être intégré.

(iii) Dans cette même optique, il serait intéressant d'étudier la saisonnalité. En effet, il est démontré que la saisonnalité a un effet sur le taux d'infection des chiroptères par les virus, sur le mode de vie et le déplacement des chiroptères (chapitre 1, II. B.2.4.).

(iv) La prise en compte d'un plus large panel de facteurs environnementaux et sociodémographiques serait à privilégier afin de caractériser au maximum les milieux d'origine des chiroptères et les comportements humains (l'utilisation des chiroptères dans les traditions humaines, la mobilité des chasseurs et vendeurs de chiroptères, les paramètres économiques, etc.) .

(v) La zone d'étude autour des sites de collecte a été estimée sur la base des connaissances générales sur les mouvements des populations humaine et de chiroptères. Le rayon de la zone d'étude autour des sites de collecte pourrait être aussi une variable à prendre en compte et à intégrer dans l'étude (5km, 10km, 20km, 30km), afin de s'assurer du modèle prédictif le plus ajusté à nos données, comme cela a déjà été présenté lors d'études similaires (Smith *et al.*, 2011).

Il est à noter que l'impact de la fragmentation des paysages sur les chiroptères est un axe de recherche très documenté, notamment pour la forêt amazonienne ([revue bibliographique](#)), et nécessiterait d'être étudié en ASE (Broadbent *et al.*, 2008; Presley *et al.*,

2008; Klingbeil et Willig, 2009). Ces recherches soulignent au passage, le déséquilibre des connaissances accumulées dans les zones néotropicale et paléotropicale. Les travaux présentés dans ce chapitre montrent toutefois que le critère de fragmentation n'est pas suffisant à lui seul à rendre compte de la complexité du système. C'est l'association de l'indice de fragmentation avec l'indice de densité des forêts et également avec d'autres paramètres de profils environnementaux qui permettent d'obtenir le niveau de discrimination attendu.

Ce chapitre a montré la nécessité d'augmenter les connaissances sur l'écologie des chiroptères et les mouvements des populations. Cet aspect reste difficile à étudier dans une zone géographique où ces animaux sont des espèces protégées par la loi (Racey, 2013; Williams-Guillén *et al.*, 2016). Si cela n'empêche en rien la chasse, le trafic et la consommation illégale des chiroptères, il est difficile d'obtenir les autorisations auprès des gouvernements, pour suivre les communautés de chiroptères au Cambodge et au Laos, et conduire des projets sur l'étude des virus chez ces hôtes à moyen et long termes. La reconnaissance des chiroptères en tant que réservoirs de virus zoonotiques émergents soulignent la nécessité d'étudier l'impact des modifications environnementales sur les populations de chiroptères (Calisher *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007), et notamment en Asie du Sud-Est, où le processus de déforestation est le plus fort actuellement (Achard *et al.*, 2002; Sodhi *et al.*, 2004; Stibig *et al.*, 2014).

Dans un cadre plus large, le but de ce genre d'étude est d'analyser de potentiels facteurs d'émergence de zoonoses virales. Pour répondre à cette problématique, une étude plus structurée, avec un échantillonnage planifié et qui présente une plus forte homogénéité des sites de collecte et des espèces de chiroptères à prélever, serait judicieuse. Un suivi dans

le temps permettrait de prendre en compte les saisons dans l'analyse. De plus, l'intégration de plus nombreux paramètres environnementaux et sociodémographiques, ainsi que des données sur l'écologie de chaque genre de chiroptère serait également intéressante pour présenter un panel complet de variables explicatives potentielles. Enfin, des analyses multivariées sur l'ensemble de ces variables permettraient d'étudier leur potentiel impact sur la prévalence des virus chez les chiroptères dans les différents milieux, et ainsi définir les zones où le risque d'émergence serait plus élevé.

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous rapportons pour la première fois la circulation de coronavirus et d'astrovirus chez les chiroptères au Cambodge et au Laos. De nombreuses souches ont été mises en évidence, dont certaines semblent appartenir à des groupes où le passage de la barrière d'espèce hôte a déjà été observé. L'ensemble de ce travail souligne la nécessité de continuer à étudier les chiroptères. Ceci est d'autant plus pertinent que si deux familles de virus ont été étudiées dans ce travail de thèse, d'autres familles virales ont également été mises en évidence dans le cadre du projet PREDICT (non publié). L'IPC a par ailleurs, récemment mis en évidence la circulation du virus Nipah chez des chiroptères au Cambodge.

La dernière partie de ce travail de thèse a apporté une méthodologie permettant de définir des corrélations entre types de virus portés par les chauves-souris et profils environnementaux mais a aussi souligné la nécessité de mettre en place dans la mesure autorisée par le critère d'espèce protégée, un vrai plan d'échantillonnage, qui inclurait les aspects environnementaux et l'écologie des chiroptères. En effet, un échantillonnage mieux structuré dans l'espace et dans le temps avec des sites de collecte réguliers, permettrait de mieux prendre en compte les nombreux paramètres nécessaires à une analyse complète des facteurs influant sur la présence de virus chez les chiroptères. La mise en place d'une surveillance active de ces territoires serait une perspective intéressante, qui comprendrait notamment une surveillance sérologique des chiroptères et individus à leur contact (Hommes, bétail) combinée à des travaux de détection moléculaire des virus.

Les difficultés rencontrées lors des tentatives de caractérisation moléculaire des virus et les nombreuses techniques explorées nous ont permis de soulever l'importance de la qualité des échantillons : des captures et des prélèvements sur des animaux vivants ou fraîchement euthanasiés permettraient d'augmenter la qualité du matériel biologique et d'accroître les chances de détection du matériel viral potentiellement présent dans les échantillons. La préparation du matériel génétique viral, comme la capture et l'amplification du génome, avant la mise en place de techniques de caractérisation moléculaire adaptées est une étape cruciale.

Notre étude confirme l'utilité de considérer l'implication des chiroptères en santé publique. En effet, dans ce travail, nous avons vu que ces animaux possèdent des caractéristiques écologiques et biologiques particulières et qui en font d'importants réservoirs de virus potentiellement zoonotiques. Les chiroptères sont capables de supporter des infections virales sans développer de symptômes. Leur capacité à voler et leur mode de vie grégaire, permet l'amplification et la diffusion rapide, et sur de longues distances de virus pathogènes pour l'Homme. Dans le contexte d'une "seule santé" ("*One Health*"), il doit être gardé à l'esprit que 76% des virus pathogènes pour l'Homme ont une origine animale (Taylor *et al.*, 2001), et qu'il est nécessaire de continuer les efforts de recherche sur les hôtes chiroptères, ainsi que chez les autres mammifères sauvages présents aux niveaux des interfaces avec l'Homme, comme les rongeurs, les primates, mais aussi le bétail.

Dans cette perspective, la communication avec les autorités gouvernementales sur l'importance écologique et les risques associés aux chiroptères est primordiale. La conservation des communautés de chiroptères est une problématique grandissante en Asie (Voigt et Kingston, 2016), tout comme la protection des populations contre de potentielles épidémies (notamment après l'épidémie récente du virus Ebola en Afrique de l'Ouest, et les foyers de virus Nipah au Bangladesh) (Horby *et al.*, 2013). La communication avec les autorités doit être adroite, afin d'éviter des prises de décision trop extrêmes, comme l'illustre

l'exemple de l'abattage massif de 20% de la population de roussettes noires (*Pteropus niger*) à l'île Maurice en 2015, malgré l'avis contraire des experts écologues, car jugées nuisibles pour les plantations (Florens, 2015). Un travail d'éducation est à envisager au niveau de la population, dans le but d'expliquer le rôle environnemental des chiroptères (pollinisation, dispersion des graines, régulation des populations d'insectes) mais aussi leur implication en santé publique. Le but serait de sensibiliser les communautés en contact avec les chiroptères (au travers de la chasse et de la collecte de guano) sur les risques de circulation de virus potentiellement pathogènes chez ces hôtes.

Toutefois, les campagnes de sensibilisation étant toujours compensées par des cadeaux ou de l'argent afin de garantir la présence, il conviendrait d'être conscient des limites quant à l'impact de cette éducation sur les populations locales. Un travail de sensibilisation sur ces aspects peut être considéré comme secondaire tant que les problématiques prioritaires, comme l'accès à l'eau et à l'alimentation, ne sont pas réglées. En effet, pour beaucoup de populations vivant en contact avec les chiroptères, la chasse ou la collecte de guano représente souvent un moyen de subsistance de base.

Enfin, alors qu'une réelle implication des gouvernements cambodgien et laotien serait indispensable dans la résolution de ce problème, une faible intégration de la santé humaine dans la socio-économie des pays reste à déplorer (Paphassarang *et al.*, 2002; Oum *et al.*, 2005). Dans leur étude, Grace *et al.* soulignent pourtant la prise de conscience des intervenants de santé sur les facteurs écologiques et socio-économiques associés aux maladies émergentes de leur pays d'origine (Grace *et al.*, 2011). Les demandes pour prioriser la prise en charge des maladies, le développement des études épidémiologiques et l'impact économique des maladies émergentes sont bien réelles, et les gouvernements semblent progressivement prendre conscience des déterminants écologiques et sociaux de la santé. Une

étude plus multidisciplinaire permettrait certainement de mieux rendre compte de ces aspects (Mayer, 2000; Rock *et al.*, 2009; Daszak *et al.*, 2012).

Annexes

Annexe 1

Liste des virus détectés chez les chiroptères, par famille de virus. La liste des chiroptères dans le tableau correspond aux hôtes chez lesquels les virus ont été obtenus ou détectés la première fois, et est non exhaustive.

Famille virale	genre, groupe ou sous groupe de virus*	espèce chiroptère** (nom vernaculaire en anglais)
F/ Adenoviridae	G/ Mastadenovirus	
	virus Ryukyu	<i>Pteropus dasymallus yayeyamae</i> (Ryukyu flying-fox)
	Bat adenovirus 2	<i>Pipistrellus pipistrellus</i> (Common pipistrelle)
	BtAdV 4	<i>Rousettus lechenaulti</i> (Leschenault's rousette)
F/ Arenaviridae	G/ Arenavirus	
	Tacaribe virus	<i>Artibeus lituratus</i> (great fruit-eating bat), <i>A. jamaicensis</i> (Jamaican fruit-eating bat)
F/ Astroviridae^a	G/Mamastrovirus	
	Multiples astrovirus	<i>Hipposideros</i> sp., <i>Rhinolophus</i> sp., <i>Ia io</i> , <i>Miniopterus</i> sp., <i>Myotis</i> sp. <i>Pipistrellus</i> sp., <i>Taphozous</i> sp., <i>Megaderma</i> sp., <i>Scotophilus</i> sp., <i>Rousettus</i> sp.
F/ Rhabdoviridae	G/ Lyssavirus	
	Rabies virus (RABV)	<i>Eptesicus fuscus</i> (Big brown bat), <i>Tadarida brasiliensis</i> (Brazilian free-tail bat), <i>Lasionycteris noctivagans</i> (Silver-haired bat), <i>Perimyotis subflavus</i> (Tri-coloured bat), <i>Desmodus rotundus</i> (Vampire bat)
	Lagos bat virus	<i>Eidolon helvum</i> (African straw-coloured fruit bat), <i>Micropteropus pusillus</i> (Peters' lesser epauletted fruit bat), <i>Epomops dobsonii</i> (Dobson's epauletted fruit bat), <i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slitfaced bat)
	Duvenhage virus	<i>Epomophorus wahlbergi</i> (Wahlberg's epauletted fruit bat) <i>Miniopterus</i> sp., <i>Nyctalus noctula</i> (noctule), <i>Vespertilio murinus</i> (parti-coloured bat), <i>Nycteris thebaica</i> (Egyptian slit-faced bat)
	Australian bat lyssavirus (ABLV)	Multiples espèces de <i>Pteropus</i> spp., <i>Microchiroptera</i> sp., <i>Saccolaimus flaviventris</i> (yellow-bellied pouched bat)
	European bat lyssavirus 1 (EBLV-1)	<i>Eptesicus serotinus</i> (serotine bat), <i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)
	European bat lyssavirus 2 (EBLV-2)	<i>Myotis myotis</i> (greater mouse-eared bat), <i>Myotis dasycneme</i> (pond bat), <i>Myotis nattereri</i> (Natterer's bat), <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreiber's bent-winged bat), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat), <i>Myotis daubentonii</i> (Daubenton's bat)
	Aravan virus	<i>Myotis blythii</i> (lesser mouse-eared bat)

Khujand virus	<i>Myotis mystacinus</i> (whiskered bat)
Irkut virus	<i>Murina leucogaster</i> (greater tube-nosed bat)
West Caucasian bat virus	<i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreiber's bent-winged bat)
G/ non assigné	
Gossas virus	<i>Tadarida</i> sp.
Kern Canyon virus	<i>Myotis yumanensis</i> (Yuma bat)
Mount Elgon bat virus	<i>Rhinolophus eloquens</i> (eloquent horseshoe bat)
Oita 296 virus	<i>Rhinolophus cornutus</i> (little Japanese horseshoe bat)

F/ Orthomyxoviridae G/ Influenza virus A

Influenza A virus	<i>Nyctalus noctula</i> (noctule bat)
-------------------	---------------------------------------

F/ Paramyxoviridae

G/ Henipavirus

Hendra virus	<i>Pteropus alecto</i> (black flying fox), <i>Pteropus poliocephalus</i> (greyheaded flying fox), <i>Pteropus scapulatus</i> (little red flying fox), <i>Pteropus conspicillatus</i> (spectacled flying fox)
Nipah virus	<i>Pteropus hypomelanus</i> (variable flying fox), <i>Pteropus vampyrus</i> (large flying fox), <i>Pteropus lyle</i> (Lyle's flying fox)
Mapuera virus	<i>Sturnira lilium</i> (yellow epauletted bat)
Menangle virus	<i>Pteropus poliocephalus</i> (grey-headed flying fox)
Tioman virus	<i>Pteropus</i> sp.
G/ non assigné	
A parainfluenza virus	<i>Rousettus leschenaultii</i> (Leschenault's rousette)

F/ Coronaviridae^b

G/ Beta coronavirus^a

SARS coronavirus	<i>Rhinolophus sinicus</i> (Chinese horseshoe bat), <i>Rhinolophus pearsonii</i> (Pearson's horseshoe bat)
MERS coronavirus (séquence 190 nt)	<i>Taphozous perforatus</i> (Egyptian tomb bat)
NeoCoV	<i>Neoromicia capensis</i> (Cape serotine)
HKU4 et HKU5	<i>Rousettus lechenaulti</i> (Leschenault's rousette)
HKU9 coronavirus	<i>Rousettus lechenaulti</i> (Leschenault's rousette)
G/ Alphacoronavirus^a	
Nombreuses souches	<i>Hipposideros</i> sp., <i>Chaerophon</i> sp., <i>Miniopterus</i> sp., <i>Eptesicus</i> sp., <i>Myotis</i> sp., <i>Rousettus</i> sp.

F/ Togaviridae		G/ Alphavirus
	Chikungunya virus	<i>Scotophilus</i> sp., <i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette), <i>Hipposideros caffer</i> (Sundevall's leaf-nosed bat), <i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat)
	Sindbis virus	<i>Rhinolophidae</i> sp., <i>Hipposideridae</i> sp
	Venezuelan equine encephalitis virus	<i>Desmodus rotundus</i> (vampire bat), <i>Uroderma bilobatum</i> (tentmaking bat), <i>Artibeus phaeotis</i> (pygmy fruit-eating bat)
F: Filoviridae		
	G/ Marburgvirus	
	Marburg virus	<i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette), <i>Rhinolophus eloquens</i> , <i>Miniopterus inflatus</i> (Greater long-fingered bat)
	G/ Ebolavirus	
	Ebola virus	<i>Hypsignathus monstrosus</i> (Hammer-headed fruit bat) <i>Epomops franqueti</i> (Franquet's epauletted fruit bat), <i>Rousettus aegyptiacus</i> , <i>Myonycteris torquata</i> (Little collared fruit bat)
	G/ Cuevavirus	
	Lloviu virus	<i>Epomops franqueti</i> (Franquet's epauletted fruit bat) <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers's long-fingered bat) <i>Myonycteris torquat</i> (Little collared fruit bat)
F/ Flaviviridae		G/ Flavivirus
	Bukalasa bat virus	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Tadarida condylura</i> (Angola free-tailed bat)
	Carey Island virus	<i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat), <i>Macroglossus minimus</i> (lesser long-tongued fruit bat)
	Central European encephalitis virus	espèce chiroptère non identifiée
	Dakar bat virus	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Taphozous perforatus</i> (Egyptian tomb bat), <i>Scotophilus</i> sp., <i>Mops condylurus</i> (Angola freetailed bat)
	Entebbe bat virus	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Mops condylurus</i> (Angolafree-tailed bat)
	Japanese encephalitis virus	<i>Hipposideros armiger terasensis</i> (great roundleaf bat) <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreiber's longfingered bat), <i>Rhinolophus cornutus</i> (little Japanese horseshoe bat)
	Jugra virus	<i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat)
	Kyasanur Forest disease virus	<i>Rhinolophus rouxi</i> (rufous horseshoe bat), <i>Cynopterus sphinx</i> (greater short-nosed fruit bat)

Montana myotis leucoencephalitis virus	<i>Myotis lucifugus</i> (little brown bat)
Phnom-Penh bat virus	<i>Eonycteris spelaea</i> (lesser dawn bat), <i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser)
Rio Bravo virus	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i> (Mexican free-tailed bat), <i>Eptesicus fuscus</i> (big brown bat)
St. Louis encephalitis virus	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i> (Mexican free-tailed bat)
Saboya virus	<i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slit-faced bat)
Sokuluk virus	<i>Pipistrellus pipistrellus</i> (common pipistrelle)
Tamana bat virus	<i>Pteronotus parnellii</i> (Parnell's moustached bat)
Uganda S virus	<i>Rousettus</i> sp., <i>Tadarida</i> sp.
Yokose virus	espèce chiroptère non identifiée

F/ Bunyaviridae,

G/ Bunyavirus

Catu virus	<i>Molossus obscurus</i> (ou <i>Molossus currentium</i>)
Guama virus	espèce chiroptère non identifiée
Nepuyo virus	<i>Artibeus jamaicensis</i> (Jamaican fruit-eating bat), <i>A. lituratus</i> (great Fruit-eating bat)

G/ Hantavirus

Hantaan virus	<i>Eptesicus serotinus</i> (serotine bat), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (Greater horseshoe bat)
---------------	---

G/ Phlebovirus

Rift Valley fever virus	<i>Micropteropus pusillus</i> (Peter's pygmy epauletted fruit bat), <i>Hipposideros abae</i> (Aba leaf-nosed bat), <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreiber's long-fingered bat), <i>Hipposideros caffer</i> (Sundevall's leaf-nosed bat), <i>Epomops franqueti</i> (Franquet's epauletted bat), <i>Glauconycteris argentata</i> (common butterfly bat)
Toscana virus	<i>Pipistrellus kuhlii</i> (Kuhl's pipistrelle)
G/ non assigné	
Kaeng Khoi virus	<i>Chaerephon plicatus</i> (wrinkle-lipped free-tailed bat)
Bangui virus	<i>Scotophilus</i> sp., <i>Pipistrellus</i> sp., <i>Tadarida</i> sp.

F/ Reoviridae

G/ Orbivirus

Ife virus	<i>Eidolon helvum</i> (straw-coloured fruit bat)
-----------	--

	Japanaut virus	<i>Syconycteris australis</i> (southern blossom bat)
	Fomede virus	<i>Nycteris nana</i> (dwarf slit-faced bat), <i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slit-faced bat)
	G/ Orthoreovirus	
	Nelson Bay virus	<i>Pteropus poliocephalus</i> (grey-headed flying fox)
	Pulau virus	<i>Pteropus hypomelanus</i> (variable flying fox)
	Broome virus	<i>Pteropus alecto</i> (black flying fox)
F/ Herpesviridae	G/ unassigned	
	Agua Preta virus	<i>Carollia subrufa</i> (grey short-tailed bat)
	A cytomegalovirus	<i>Myotis lucifugus</i> (little brown bat)
	Parixa virus	<i>Lonchophylla thomasi</i> (Thomas's nectar bat)
F/ Picornaviridae	G/ non assigné	
	Juruaca virus	espèce chiroptère non identifiée
Non classés		
	Issyk-Kul (Keterah virus)	<i>Chaerephon plicatus</i> (wrinkle-lipped free-tailed bat), <i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat), <i>Eonycteris spelaea</i> (lesser dawn), <i>Eptesicus serotinus</i> (common serotine), <i>Hipposideros diadema</i> (diadem leaf-nosed bat), <i>Nyctalus noctula</i> (noctule), <i>Myotis blythii</i> (lesser mouse-eared myotis), <i>Pipistrellus pipistrellus</i> (common pipistrelle), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat), <i>Rhinolophus lepidus</i> (Blyth's horseshoe bat), <i>Rhinolophus horsfeldii</i> , <i>Scotophilus kuhlii</i> (lesser Asiatic yellow house bat), <i>Taphozous melanopogon</i> (blackbearded tomb bat)
	Mojui dos Campos virus	espèce chiroptère non identifiée
	Yogue virus	<i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)
	Kasokero virus	<i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)

*La liste des chiroptères dans le tableau correspond aux hôtes chez lesquels les virus ont été obtenus ou détectés la première fois (Certains de ces virus ou de séquences virales sont maintenant détectés chez d'autres espèces chiroptères, dont la liste de ce tableau n'est pas exhaustive)

**Pour certains virus, la séquence nucléique détectée n'a pas permis d'identifier la famille, le groupe ou l'espèce du virus.

^a la liste complète et détaillée de toutes les souches d'astrovirus et leur hôtes est présentée dans le tableau 6, chapitre 1.

^b la liste complète et détaillée de toutes les souches de coronavirus et leur hôtes est présentée en annexe 2.

[Retour au chapitre 1](#)

Annexe 2

Études sur la détection de coronavirus (CoVs) chez les chiroptères dans le monde.

Référence	Pays	Hôtes chiroptères	Coronavirus détecté
Lau <i>et al.</i> , 2005	Chine	<i>Rhinolophus sinicus</i>	βCoV-B (SL-CoV)
Li <i>et al.</i> , 2005	Chine	<i>Rh. pearsoni</i> <i>Rh. macrotis</i> <i>Rh. ferrumequinum</i>	βCoV-B (SL-CoV)
Poon <i>et al.</i> , 2005	Hong Kong	<i>Miniopterus magnater</i> <i>Miniopterus pusillus</i> <i>Miniopterus schreibersii</i>	αCoVs
Chu <i>et al.</i> , 2006	Hong Kong	<i>Min. magnater</i> <i>Min. pusillus</i>	αCoVs (bat-CoV1A, bat-CoV1B, bat-CoV-HKU8)
Tang <i>et al.</i> , 2006	Chine	<i>Rh. ferrumequinum</i> <i>Rh. macrotis</i> <i>Rh. sinicus</i>	βCoV-B (SL-CoV)
Woo <i>et al.</i> , 2006	Hong Kong	<i>Rh. sinicus</i>	βCoV-B (SL-CoV)
Dominguez <i>et al.</i> , 2007	Amérique du Nord	<i>Eptesicus fuscus</i> <i>Myotis occultus</i>	αCoV
Woo <i>et al.</i> , 2007	Hong Kong	<i>Rousettus lechenaulti</i>	βCoV-C (bat-CoV HKU4, bat-CoV HKU5) βCoV-D (bat-CoV HKU9) αCoV (batCoV-HKU10)
Brandao <i>et al.</i> , 2008	Brésil	<i>Desmodus rotundus</i>	βCoV (BatCoV DR/2007)
Carrington <i>et al.</i> , 2008	Trinidad	<i>Carollia perspicillata</i> <i>Glossophaga soricina</i>	αCoV
Gloza-Rausch <i>et al.</i> , 2008	Allemagne	<i>Myotis dasycneme</i> <i>M. daubentonii</i> <i>Pipistrellus nathusii</i> <i>P. pygmaeus</i>	αCoV
Pfefferle <i>et al.</i> , 2009	Ghana	<i>Hipposideros ruber</i>	αCoV et βCoV
Misra <i>et al.</i> , 2009	Canada	<i>M. lucifugus</i>	αCoV
Tong <i>et al.</i> , 2009	Kenya	- <i>Chaerophon</i> sp. - <i>Chaerophon pumilus</i> , <i>Miniopterus</i> sp. - <i>Otomops martinsseni</i> - <i>Eidolon helvum</i> - <i>H. commersoni</i> , <i>R. aegyptiacus</i>	-αCoVs et βCoV-B -αCoV (souches batCoV1A, batHKU8-like) -αCoV (batCoV-HKU7 like) -βCoV (BtKY18-like) -βCoV- D
Reusken <i>et al.</i> , 2010	Pays-Bas	- <i>Myotis daubentonii</i> , <i>M. dasycneme</i> , <i>P. pipistrellus</i> , <i>Nyctalus noctula</i> - <i>P. pipistrellus</i>	-αCoV -βCoV lineage C
Watanabe <i>et al.</i> , 2010	Philippines	- <i>Scotophilus kuhlii</i> - <i>Eonycteris spelaea</i> ,	-αCoV (groupe A512) -βCoV- C

		<i>Cynopterus brachyotis</i> <i>Ptenochirus jagori</i> <i>R. amplexicaudatus</i>	
Quan et al., 2010	Nigeria	<i>Hipposideros commersoni</i>	βCoV-B (SL-CoV)
Drexler et al., 2010	Allemagne	<i>Nyctalus leisleri</i> <i>Min. schreibersii</i> <i>Rh. euryale</i> <i>Rh. blasii</i> <i>Rh. ferrumequinum</i> <i>Rh. mehelyi</i> <i>- Rh. euryale</i> <i>Rh. blasii</i> <i>Rh. ferrumequinum</i> <i>Rh. mehelyi</i>	-αCoV (batCoV/BNM98-30, batCoV/BNM98-30, batCoV-HKU7, HKU8 et 1A) - βCoV-B (SL-CoV)
Rihtaric et al., 2010	Slovénie	<i>Rh. hipposideros</i>	-βCoV-B (SL-CoV)
Gouilh et al., 2011 **	Thaïlande	<i>-Hipposideros larvatus</i> <i>-Hipposideros armiger</i>	-βCoV -αCoV
Falcón et al., 2011	Espagne	<i>Min. schreibersii</i> <i>M. blythii</i> <i>M. daubentonii</i> <i>M. myotis</i> <i>Nyctalus lasiopterus</i> <i>Pipistrellus kuhlii</i> <i>Pipistrellus sp.</i> <i>Hypsugo savii</i> <i>Eptesicus isabellinus</i> <i>Hypsugo savii</i>	-αCoVs -βCoV-C
August et al., 2012	U-K	<i>Myotis nattereri</i> , <i>M. daubentonii</i>	αCoVs
Shirato et al., 2012	Japon	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	αCoV
Lau et al., 2012	Chine: Guangdong	<i>-Rousettus leschenauti</i>	αCoV (batCoV-HKU10)
	Hong Kong	<i>-Hipposideros pomona</i>	
Tsuda et al., 2012	Philippines	<i>-Cynopterus brachyotis</i> , <i>Ptenochirus jagori</i> , <i>Emballonura alecto</i> , <i>Rhinolophus rufus</i> , <i>R. amplexicaudatus</i> , <i>H. diadema</i> , <i>Macroglossus minimus</i> <i>- Hipposideros diadema</i>	-βCoV-D -αCoV (type batCoV-HKU7 et HKU8)
Tao et al., 2012	Kenya	<i>-Rousettus aegyptiacus</i> (BtKY06), <i>Eidolon</i> (BtKY24) <i>Chaerephon</i> (BtKY22), <i>Miniopterus</i> <i>Chaerephon</i> (BtKY41), <i>Cardioderma</i> (BtKY43)	-βCoV-D (BtKY24, BtKY06) - αCoV (BtKY22, BtKY41, BtKY43) (BtKY27, BtKY33),
Wu et al., 2012	Chine (Hainan)	<i>Rh. affinis</i> <i>Miniopterus Schreibersii</i>	-αCoV (batCoV 1A et 1B)
Annan et al., 2013	Europe et Ghana	<i>Nycteris sp.</i> <i>Pipistrellus sp.</i>	βCoV-C
Geldenhuys et al., 2013	Afrique du Sud	<i>-Neoromicia capensis</i> <i>-Miniopterus sp.</i> <i>-Mops midas</i>	- αCoV (Neo-BtCoV167/SA/07) - αCoV (Mi-BtCoV Irene) - αCoV (Mops-BtCoV1364/SA/11, proche de BtKY22)
Lima et al., 2013	Brésil	<i>Molossus molossus</i>	-αCoVs

Anthony <i>et al.</i>, 2013	Sud du Mexique	<i>Tadarida brasiliensis</i>	
		<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	-βCoV -C
		<i>-Pteronotus parnelli</i>	-βCoV-D
		<i>Artibeus lituratus</i> <i>Artibeus phaeotis</i>	
Góes <i>et al.</i>, 2013	Brésil et Mexique	<i>-Molossus rufus</i> , <i>Molossus molossus</i>	αCoVs
		<i>-Pteronotus dayi</i>	-βCoV C
Corman <i>et al.</i>, 2013	Brésil Costa Rica Panama	<i>-Carollia perspicillata</i> , <i>C. brevicauda</i>	-αCoV
		<i>-Anoura geoffroyi</i>	-βCoV
		<i>Artibeus jamaicensis</i> <i>Artibeus lituratus</i>	
		<i>Phyllostomus discolor</i> <i>Pteronotus parnellii</i>	
		<i>Molossus currentium</i> <i>Molossus rufus</i>	
		<i>-Pipistrellus kuhlii</i>	-αCoV
		<i>-Rh. hipposideros</i>	-βCoV-B
		<i>-P. kuhlii</i> , <i>Nyctalus noctula</i> , <i>Hypsugo savii</i>	-βCoV- C
Wacharapluesadee <i>et al.</i>, 2013	Thaïlande	<i>NA (à partir de guano)</i>	βCoV-C
Yang <i>et al.</i>, 2013	Chine	<i>Rhinolophus pusillus et Chaerephon plicata</i>	SL-CoV
Ithete <i>et al.</i>, 2013	Afrique du Sud	<i>Neoromicia . zuluensis</i>	SβCoV-D
Yang <i>et al.</i>, 2014	Chine	<i>Vespertilio superans</i>	βCoV-C
Kemenesi <i>et al.</i>, 2014	Hongrie	<i>-Rh. euryale</i> ,	-SL CoV
		<i>-Rh. ferrumequinum</i> , <i>Rh. hipposideros</i> , <i>M. daubentonii</i> , <i>M. myotis</i> , <i>M. nattereri</i> , <i>P. pygmaeus</i>	-αCoV
He <i>et al.</i>, 2014	Chine (Yunnan)	<i>-Rhinolophus ferrumequinum</i>	-αCoVs -SL-CoV (LYRa11)
		<i>Rhinolophus hipposideros</i> <i>Myotis daubentonii</i> <i>Myotis davidii</i>	
		<i>-Rhinolophus affinis</i>	
		<i>Dobsonia moluccensis</i>	βCoV-D
		<i>M. nattereri</i>	αCoVs
Anindita <i>et al.</i>, 2015	Indonésie	<i>P. nathusii</i> , <i>P. pygmaeus</i> <i>M. bechsteinii</i>	
Goffard <i>et al.</i>, 2015	France	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	αCoV
Moreira-Soto <i>et al.</i>, 2015	Costa Rica	<i>C. perspicillata</i> , <i>A. jamaicensis</i> , <i>G. soricina</i> <i>C. castanea</i>	αCoVs
		<i>-Cynopterus brachyotis</i> , <i>Scotophilus kuhlii</i> , <i>Scotophilus heathii</i>	- βCoV-D
		<i>-Cynopterus sphinx</i>	- αCoV (batCoV-HKU10)
		<i>-Taphozous melanopogon</i>	- αCoV

		- <i>Hipposideros armiger</i> - <i>Megaderma lyra</i> - <i>Rh. shameli</i> - <i>Miniopterus magnater</i> - <i>Miniopterus pusillus</i> - <i>Miniopterus schreibersii</i> - <i>Scotophilus heathii</i>	- αCoV (batCoV-1A/B, HKU10) - αCoV (batCoV-HKU10) - αCoV (batCoV-HKU10, HKU2) - αCoV (batCoV-1A/B, HKU7) - αCoV (batCoV-HKU8) - αCoV (batCoV-1A/B, HKU7, HKU8) - αCoV-A512
Razanajatovo et al., 2015	Madagascar	<i>Pteropus rufus</i> <i>Eidolon dupreanum</i>	βCoV-D
Simas et al., 2015	Brésil	<i>Molossus molossus</i> , <i>M. rufus</i> , and <i>Tadarida brasiliensis</i>	αCoV
Kim et al., 2016	Corée du Sud	- <i>Rh. ferrumequinum</i> , <i>M. macrodactylus</i> , <i>Miniopterus schreibersii</i> - <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> - <i>guano</i> (espèce inconnue)	-αCOVs -βCoV-B (SL-CoV) - βCoV-C
Xu et al., 2016	Tibet	- <i>Rh ferrumequinum</i> , <i>Myotis daubentonii</i> - <i>Murina leucogaster</i> <i>Rh.sinicus</i>	-βCoV-B -αCoV
Yang et al., 2016	Chine	<i>Rh. sinicus</i>	βCoV-B (SL-CoV, souche WIV16)
Du et al., 2016	Chine (5 provinces)	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	αCoV
Chen et al., 2016	Taïwan	<i>Rhinolophus monoceros</i>	βCoV-B (SL-CoV)

Rh. : *Rhinolophus*; *M.* : *Myotis*; *R.* : *Rousettus*; *C.* : *Carollia*; *Min.* : *Miniopterus*; *P.* : *Pipistrellus*; *H.* : *Hipposideros*

βCoV-B : sous-groupe B des βCOVs, incluant les souches SRAS-CoV et SRAS-like-CoV (SL-CoV); βCoV-C : sous-groupe C des βCOVs, incluant les souches MERS-CoV et batCoV-HKU4 et HKU5; βCoV-D : sous-groupe D des βCOVs, incluant uniquement des CoVs de chiroptères génétiquement proches des souches batCoV-HKU9.

[Retour au chapitre 1](#)

Poster 1452. ASTMH, 64th Annual Meeting, 25-29th October 2015, Philadelphia, USA. Author contact: alacroix@pasteur-kh.org

Detection of coronaviruses in bats in Cambodia and Lao PDR

Audrey Lacroix¹, Veasna Duong¹, Vibol Hul¹, Sorn San², Holi Davun², Keo Omaliss³, Sokha Chea³, Watthana Theppangna⁶, Soubanh Silithammavong⁶, Aneta Afelt⁷, Zoe Greatorex⁸, Lucy Keatts⁸, Roger Frutos⁴, Philippe Buchy¹

¹ Institut Pasteur du Cambodge, Réseau international des Instituts Pasteur, Phnom Penh, Cambodia

² National Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Cambodia

³ Forest Administration, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Cambodia

⁴ Université de Montpellier, CPBS, UMR 5236 CNRS-UMI-UM2, Montpellier, France

⁵ Wildlife Conservation Society, Cambodia

⁶ National Animal Health Laboratory, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, PDR Lao

⁷ Institute of Physical Geography, Faculty of geography and regional studies, University of Warsaw, Poland

⁸ Wildlife Conservation Society, PDR Lao

BACKGROUND

Bats have been identified as a natural reservoir for an increasing number of zoonotic viruses, such as henipaviruses or SARS-Coronavirus. Cambodia and Lao PDR host an estimated 70 and 80 species of bats respectively, including *Microchiroptera* and *Megachiroptera*. Due to evolving land-use, urban development, and agricultural expansion, bat populations settle in areas closer to human dwellings. Bats are hunted for household consumption or illegal trade, and bred in Cambodia to produce fertilizer. This situation may provide opportunities for the transmission of zoonotic agents from bats to humans.

In this study, we analyzed the presence of coronaviruses (CoVs) in bats at interfaces with human populations in Lao PDR and Cambodia.



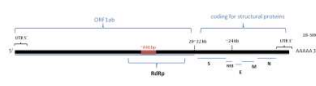
MATERIAL & METHODS



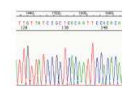
swab sampling



Extraction of RNA and amplification by RT-PCR



A region of 434 nucleotides on the RdRp gene is targeted by RT-PCR for the detection of CoV



Amplicon sequencing



Phylogenetic analysis

RESULTS

→ A total of 1879 bats collected, 3575 RT-PCR for bat coronavirus detection performed

→ From 8 Cambodian provinces and 8 Lao provinces

	Nb of positive bats / Nb of bat tested (% of positive bats)
Total	97 / 1879 (5.1%)
Cambodia	57 / 973 (5.9%)
Lao PDR	40 / 906 (4.3%)

→ 40 alpha-coronaviruses (aCoVs) and 57 beta(b)CoVs : fall into 6 clades; aCoVs cluster by host genus; bCoVs cluster by host family

→ 1 CoV detected in a pipistrelle from Cambodia: cluster in the lineage of MERS-CoV

→ 2 CoVs detected in *Myotis horsfieldii* from Cambodia seem to be genetically closely related to PEDV-CoV

→ CoVs found in bats from *Megareops sp.* and *Macroglossus sp.*

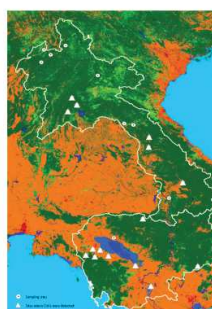


Fig1. Sampling sites in Lao PDR and Cambodia.

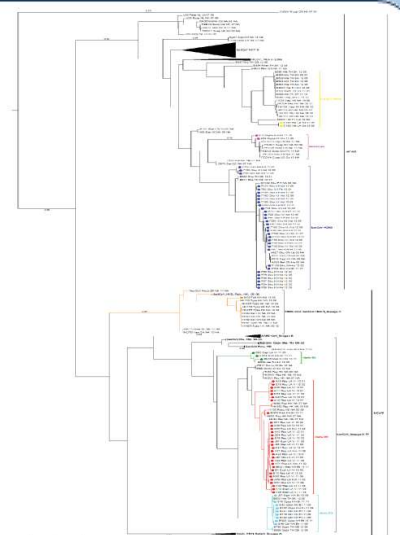


Fig2. Phylogenetic analysis of coronaviruses detected in the study (434bp of RdRp gene), using a maximum of likelihood model (GTR+G4, 10 000 bootstrap).

CONCLUSION

- First report of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia
- Two additional bat genus identified as reservoirs of CoVs : *Megareops sp.* and *Macroglossus sp.*
- Large diversity of aCoVs and bCoVs, clustered by host genus
- Most of them closely related to other known bat-CoVs which have not been involved in human or animal pathology yet
- One bCoV related to MERS-CoV, and one aCoV related to PEDV-CoV
- More molecular analyses are still needed especially on proteins and receptors involved in virus entry and specificity of host (spike protein)
- Environmental and ecological analyses will be conducted to better understand the circulation of bat populations in Lao and Cambodia and therefore CoVs they can harbor

Annexe 4

Protocole d'entretien des cellules primaires de chiroptères (CSIRO, 2012).

Medium

Recovery Media - SIGMA Product No. D8437 DMEM F-12 (containing 15mM HEPES, NaHCO₃, pyridoxine and L-glutamine) with 20% FCS 1xAnti/Anti (Gibco No. 15240-062)

Normal growth Media- SIGMA Product No. D8437 DMEM F-12 (containing 15mM HEPES, NaHCO₃, pyridoxine and L-glutamine) with 10% FCS 1xAnti/Anti (Gibco No. 15240-062)

Recovery

- Thaw frozen vial of cells as quick as possible in water bath at 37C
- Add 1ml of Recovery Media slowly into thawed vial
- Let sit for 30s
- Invert to mix a few times
- Add to 10ml tube with 2ml pipette
- Slowly add 8ml of recovery media drop wise (to reduce osmotic shock)
- Invert 10ml tube a few times
- Spin at 300xG for 5mins at room temp
- Pour off media containing DMSO
- Gently resuspend cells in recovery media
- Transfer cell suspension to flask of appropriate size
- Change from recovery media to normal growth media when cells are established

This will work for all cell types although the Microbat cultures are slower growing than the Pteropus. All these are primary, uncloned cultures and will change as passaged but seem to vary less if they are divided as soon as they are confluent.

We have had less success in the long term passage of the microbat lines you may only get 6-10 passes from them and it is important not to let them get confluent.

Cell freezing:

- Trypsinise cells
- Add medium with FCS (inactivate trypsin)
- Pellet 1K 2min
- Resuspend in appropriate volume of freezing medium (1ml/vial ~5x10⁶ cells)
 - Medium containing 20% FCS + 10% DMSO
- Into slow freeze container into -80°C freezer 24hrs
- Transfer to liquid nitrogen ASAP

[Retour au texte](#)

Annexe 5

Procédures utilisées pour l'extraction des paramètres environnementaux autour des sites de collecte

PROCEDURE 1: Methodology for extracting a area of interest from a shapefile or a raster file (ArcMap 10.3.1)

-A buffer zone around each sampling point was created using the geoprocessing tool "Buffer".

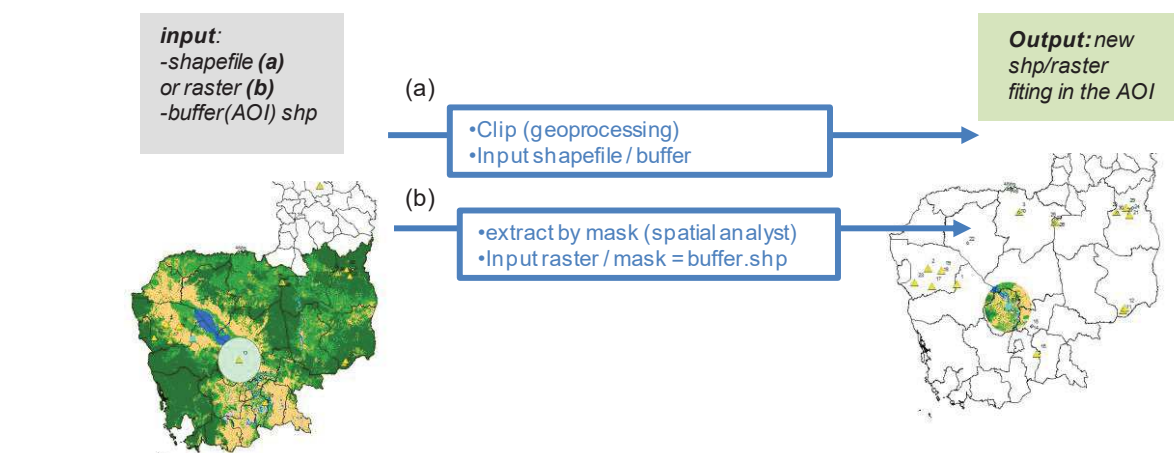
Specify the distance around the point of interest (e.g. 20km).

Area of interest (AOI) from a shapefile

- Input features that overlay the buffer zone were extracted using geoprocessing tool "Clip": The area of interest (AOI) that contains the geographic subset was created in a new shapefile.

AOI from a raster

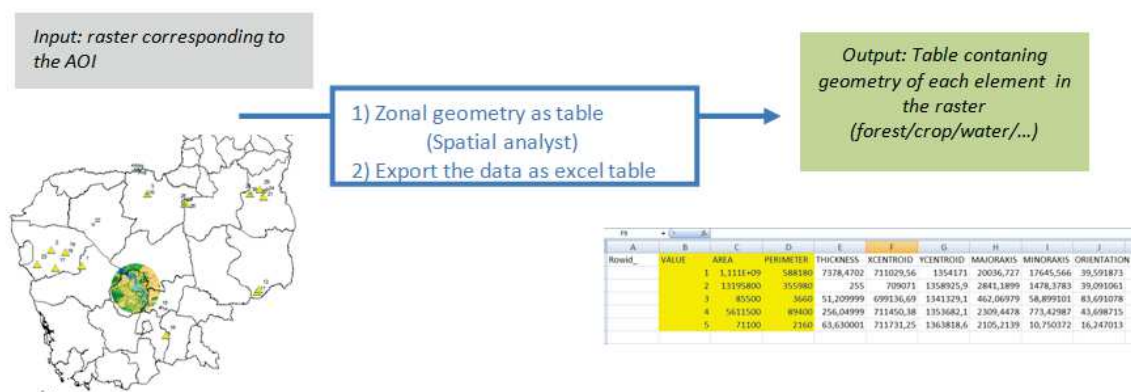
- Cells of the raster that correspond to the AOI defined by the buffer zone were extracted using the spatial analyst tool "Extract by mask". The output raster containing the cell values extracted from the input raster was created.



PROCEDURE 2: Methodology for calculating geometry measures from a raster set (ArcMap 10.3.1)

-The spatial analyst tool "zonal geometry as table" was used to calculate the geometry measures for each zone in a raster (area, perimeter, thickness, and the characteristics of ellipse).

-Results were report as a table, which was exported as a excel file by the "Export data" function.



PROCEDURE 3: Methodology for classifying density of population in AOI (ArcMap 10.3.1)

(1) In the shapefile district, containing population data, the density of population in each district was calculated by:

- (i) creating a new field in the attribute table calculating the surface ("Geometry" tool),
- (ii) creating a new field calculating the density of population in each district, using the "Field calculator" tool : [total population / surface].

(2) AOI from the District.shp was extracted (annex 3), and a new shapefile , e.g. "Clip.shp", was created.

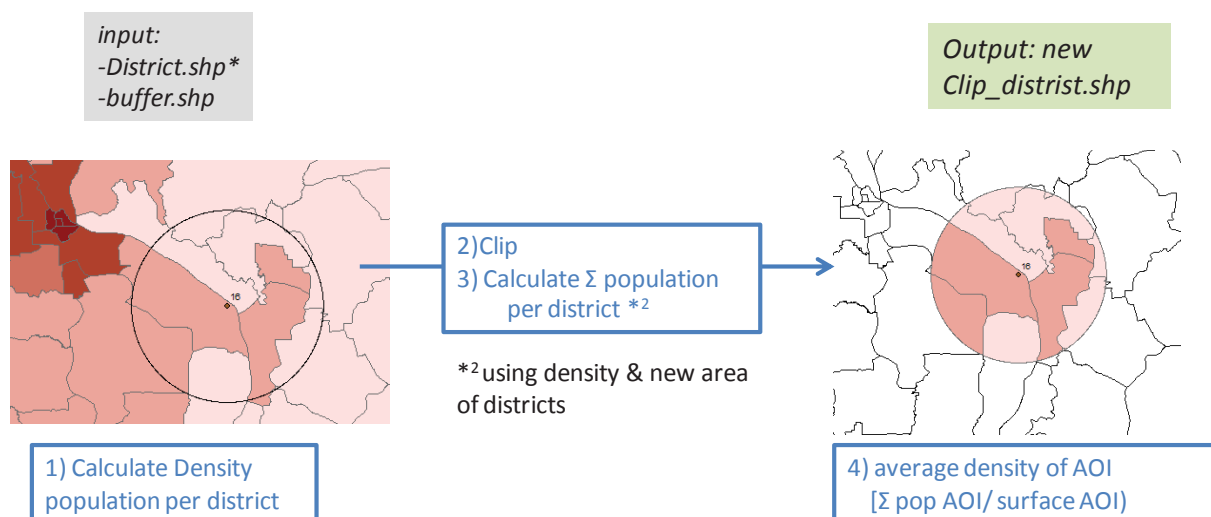
(3) In the output file "Clip.shp", the sum of total population was calculated by:

- (i) determining the area of each trimmed district (same procedure as (i)),
- (ii) calculating the population for each district using the "Field calculator" tool [Density_pop * Surface].

Results, reported as a table, were exported as a excel file by the "Export data" function.

(4) In the output file, the average density of population was obtained by:

- (i) calculating the sum of all district population,
- (ii) dividing the total population by the total surface of AOI.



[Retour au chapitre 5](#)

Annexe 6

Correspondance entre les noms de sites de collecte utilisés pour les chapitres 2, 3 et 5.

Area of Interest (AOI) chapitre5	Site de collecte utilisé dans l'article coronavirus (chapitre 2)	Site de collecte utilisé dans l'article coronavirus (chapitre 3)
1	C6	A8
2	C10	A12
3	C12	A14
4	C29	A30
5	C30	A31
6	C31	A32
7	C41	A42
8	C42	A43
9	C43	A44
10	C44	A45
11	C2	A4
12	C3	A5
13	C4	A6
14	C1	A1
15	C5	A7
16	C8	A10
17	C9	A11
18	C36	A37
19	C37	A38
20	C11	A13
21	C7	A9
22	C35	A36
23	C32	A33
24	C33	A34
25	C34	A35
26	C38	A39
27	C39	A40
28	C40	A41
29	C13	A15
30	C28	A29
31	C18	A20
32	C19	A21
33	C24	A25
34	C26	A27
35	C17	A19
36	C21	A22
37	C22	A23
38	C27	A28
39	C14	A16
40	C23	A24
41	C25	A26
42	C15	A17
43	C16	A18

[Retour au texte chapitre 5](#)

Bibliographie

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.H., Pillai, S., 2014. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Health Sciences.
- Abulude, F.O., 2007. Determination of the Chemical Composition of Bush Meats Found in Nigeria. Am. J. Food Technol. 2, 153–160.
- Achard, F., Eva, H.D., Stibig, H.-J., Mayaux, P., Gallego, J., Richards, T., Malingreau, J.-P., 2002. Determination of Deforestation Rates of the World's Humid Tropical Forests. Science 297, 999–1002. doi:10.1126/science.1070656
- Adams, R.A., Shaw, J.B., 2013. Time's Arrow in the Evolutionary Development of Bat Flight, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), Bat Evolution, Ecology, and Conservation. Springer New York, pp. 21–46.
- Alcami, A., Koszinowski, U.H., 2000. Viral mechanisms of immune evasion. Mol. Med. Today 9, 365–372.
- Al-Khannaq, M.N., Ng, K.T., Oong, X.Y., Pang, Y.K., Takebe, Y., Chook, J.B., Hanafi, N.S., Kamarulzaman, A., Tee, K.K., 2016. Molecular epidemiology and evolutionary histories of human coronavirus OC43 and HKU1 among patients with upper respiratory tract infections in Kuala Lumpur, Malaysia. Virol. J. 13. doi:10.1186/s12985-016-0488-4
- Allen, G.M., 2004. Bats: Biology, Behavior and Folklore. Dover Publications.
- Allen, L.C., Turmelle, A.S., Mendonça, M.T., Navara, K.J., Kunz, T.H., McCracken, G.F., 2008. Roosting ecology and variation in adaptive and innate immune system function in the Brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). J. Comp. Physiol. B 179, 315–323. doi:10.1007/s00360-008-0315-3
- Almeida, F.C., Giannini, N.P., DeSalle, R., Simmons, N.B., 2011. Evolutionary relationships of the old world fruit bats (Chiroptera, Pteropodidae): another star phylogeny? BMC Evol. Biol. 11, 281. doi:10.1186/1471-2148-11-281
- Alsahafi, A.J., Cheng, A.C., 2016. The epidemiology of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the Kingdom of Saudi Arabia, 2012–2015. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. 45, 1–4. doi:10.1016/j.ijid.2016.02.004
- Amman, B.R., Carroll, S.A., Reed, Z.D., Sealy, T.K., Balinandi, S., Swanepoel, R., Kemp, A., Erickson, B.R., Comer, J.A., Campbell, S., Cannon, D.L., Khristova, M.L., Atimnedi, P., Paddock, C.D., Crockett, R.J.K., Flietstra, T.D., Warfield, K.L., Unfer, R., Katongole-Mbidde, E., Downing, R., Tappero, J.W., Zaki, S.R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., Towner, J.S., 2012. Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. PLoS Pathog. 8, e1002877. doi:10.1371/journal.ppat.1002877
- Anindita, P.D., Sasaki, M., Setiyono, A., Handharyani, E., Orba, Y., Kobayashi, S., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Subangkit, M., Nakamura, I., Sawa, H., Kimura, T., 2015. Detection of coronavirus genomes in Moluccan naked-backed fruit bats in Indonesia. Arch. Virol. doi:10.1007/s00705-015-2342-1
- Appleton, H., Higgins, P.G., 1975. Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. Lancet Lond. Engl. 1, 1297.
- Arbour, N., Côté, G., Lachance, C., Tardieu, M., Cashman, N.R., Talbot, P.J., 1999. Acute and persistent infection of human neural cell lines by human coronavirus OC43. J. Virol. 73, 3338–3350.
- Arbour, N., Day, R., Newcombe, J., Talbot, P.J., 2000. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. J. Virol. 74, 8913–8921.

- Arita, H.T., Fenton, M.B., 1997. Flight and echolocation in the ecology and evolution of bats. *Trends Ecol. Evol.* 12, 53–58. doi:10.1016/S0169-5347(96)10058-6
- Arnoult, D., Carneiro, L., Tattoli, I., Girardin, S.E., 2009. The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection. *Semin. Immunol., Innate immunity: the connection with inflammation and disease* 21, 223–232. doi:10.1016/j.smim.2009.05.009
- Ashwell, D., Walston, N., 2008. An overview of the use and trade of plants and animals in traditional medicine systems in Cambodia. *TRAFFIC Southeast Asia Gt. Mekong Programme Ha Noi Vietnam*.
- Assiri, A., Mcgeer, A., Perl, T.M., Price, C.S., Al Rabeeah, A.A., Cummings, D.A.T., Alabdullatif, Z.N., Assad, M., Almulhim, A., Makhdoom, H., Madani, H., Alhakeem, R., Al-Tawfiq, J.A., Cotten, M., Watson, S.J., Kellam, P., Zumla, A.I., Memish, Z.A., 2013. Hospital Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *N. Engl. J. Med.* 369, 407–416.
- Atkins, A., Wellehan Jr., J.F.X., Childress, A.L., Archer, L.L., Fraser, W.A., Citino, S.B., 2009. Characterization of an outbreak of astroviral diarrhea in a group of cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet. Microbiol.* 136, 160–165. doi:10.1016/j.vetmic.2008.10.035
- August, T.A., Mathews, F., Nunn, M.A., 2012. Alphacoronavirus detected in bats in the United Kingdom. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 12, 530–533. doi:10.1089/vbz.2011.0829
- Babcock, G.J., Esshaki, D.J., Thomas, W.D., Ambrosino, D.M., 2004. Amino Acids 270 to 510 of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Are Required for Interaction with Receptor. *J. Virol.* 78, 4552–4560. doi:10.1128/JVI.78.9.4552-4560.2004
- Baker, M.L., Schountz, T., Wang, L.-F., 2013. Antiviral Immune Responses of Bats: A Review. *Zoonoses Public Health* 60, 104–116. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x
- Balkhy, H.H., Alenazi, T.H., Alshamrani, M.M., Baffoe-Bonnie, H., Arabi, Y., Hijazi, R., Al-Abdely, H.M., El-Saed, A., Al Johani, S., Assiri, A.M., Bin Saeed, A., 2016. Description of a Hospital Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome in a Large Tertiary Care Hospital in Saudi Arabia. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1–9. doi:10.1017/ice.2016.132
- Banyard, A.C., Evans, J.S., Luo, T.R., Fooks, A.R., 2014. Lyssaviruses and Bats: Emergence and Zoonotic Threat. *Viruses* 6, 2974–2990. doi:10.3390/v6082974
- Barquez, R., Perez, S., Miller, B., Diaz, M., 2015. *Desmodus rotundus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T6510A21979045.
- Barquez, R., Perez, S., Miller, B., Diaz, M., 2008. *Diaemus youngi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T6520A12786963.
- Barrett, R., Kuzawa, C.W., McDade, T., Armelagos, G.J., 1998. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: The Third Epidemiologic Transition. *Annu. Rev. Anthropol.* 27, 247–271.
- Bass, D.M., Qiu, S., 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J. Virol.* 74, 1810–1814.
- Bausch, D.G., Rojek, A., 2016. West Africa 2013: Re-examining Ebola. *Microbiol. Spectr.* 4. doi:10.1128/microbiolspec.EI10-0022-2016
- Bawa, K.S., 1990. Plant-Pollinator Interactions in Tropical Rain Forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 399–422.
- Becker, M.M., Graham, R.L., Donaldson, E.F., Rockx, B., Sims, A.C., Sheahan, T., Pickles, R.J., Corti, D., Johnston, R.E., Baric, R.S., Denison, M.R., 2008. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19944–19949. doi:10.1073/pnas.0808116105
- Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N., Whittaker, G.R., 2012. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4, 1011–1033. doi:10.3390/v4061011
- Bengis, R.G., Leighton, F.A., Fischer, J.R., Artois, M., Mörner, T., Tate, C.M., 2004. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev. Sci. Tech. - Off. Int. Épizooties* 23, 497–511.
- Bertram, S., Glowacka, I., Müller, M.A., Lavender, H., Gnirß, K., Nehlmeier, I., Niemeyer, D., He, Y., Simmons, G., Drosten, C., Soilleux, E.J., Jahn, O., Steffen, I., Pöhlmann, S., 2011. Cleavage and activation of the SARS-coronavirus spike-protein by human airway trypsin-like protease (HAT). *J. Virol. JVI.05300-11*. doi:10.1128/JVI.05300-11

- Bertram, S., Heurich, A., Lavender, H., Gierer, S., Danisch, S., Perin, P., Lucas, J.M., Nelson, P.S., Pöhlmann, S., Soilleux, E.J., 2012. Influenza and SARS-Coronavirus Activating Proteases TMPRSS2 and HAT Are Expressed at Multiple Sites in Human Respiratory and Gastrointestinal Tracts. *PLOS ONE* 7, e35876. doi:10.1371/journal.pone.0035876
- Blasdell, K., Cosson, J.F., Chaval, Y., Herbreteau, V., Douangboupouha, B., Jittapalapong, S., Lundqvist, A., Hugot, J.-P., Morand, S., Buchy, P., 2011. Rodent-borne hantaviruses in Cambodia, Lao PDR, and Thailand. *EcoHealth* 8, 432–443. doi:10.1007/s10393-011-0725-7
- Blasdell, K., Morand, S., Henttonen, H., Tran, A., Buchy, P., 2016. Hantavirus seropositivity in rodents in relation to habitat heterogeneity in human-shaped landscapes of Southeast Asia. *Spat. Spatio-Temporal Epidemiol.* 17, 27–35. doi:10.1016/j.sste.2016.04.002
- Blasdell, K.R., Duong, V., Eloit, M., Chretien, F., Ly, S., Hul, V., Deubel, V., Morand, S., Buchy, P., 2016. Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia. *eLife* 5, e13135. doi:10.7554/eLife.13135
- Bloom, D.E., Williamson, J.G., 1998. Demographic Transitions and Economic Miracles in Emerging Asia. *World Bank Econ. Rev.* 12, 419–455. doi:10.1093/wber/12.3.419
- Boonman, A., Bumrungsri, S., Yovel, Y., 2014. Nonecholocating Fruit Bats Produce Biosonar Clicks with Their Wings. *Curr. Biol.* 24, 2962–2967. doi:10.1016/j.cub.2014.10.077
- Bosch, A., Guix, S., Krishna, N.K., Méndez, E., Monroe, S.S., Pantin-Jackwood, M., Schultz-Cherry, S., 2010a. Nineteen new species in the genus *Mamastrovirus* in the *Astroviridae* family. *ICTV*.
- Bosch, A., Guix, S., Krishna, N.K., Méndez, E., Monroe, S.S., Pantin-Jackwood, M., Schultz-Cherry, S., 2010b. Three new species in the genus *Avastrovirus* in the *Astroviridae* family. *ICTV*.
- Bosch, B.J., Bartelink, W., Rottier, P.J.M., 2008. Cathepsin L Functionally Cleaves the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Class I Fusion Protein Upstream of Rather than Adjacent to the Fusion Peptide. *J. Virol.* 82, 8887–8890. doi:10.1128/JVI.00415-08
- Bowden, T.R., Bingham, J., Harper, J.A., Boyle, D.B., 2012. Menangle virus, a pteropid bat paramyxovirus infectious for pigs and humans, exhibits tropism for secondary lymphoid organs and intestinal epithelium in weaned pigs. *J. Gen. Virol.* 93, 1007–1016. doi:10.1099/vir.0.038448-0
- Boyles, J.G., Cryan, P.M., McCracken, G.F., Kunz, T.H., 2011. Economic Importance of Bats in Agriculture. *Science* 332, 41–42. doi:10.1126/science.1201366
- Braden, C.R., Dowell, S.F., Jernigan, D.B., Hughes, J.M., 2013. Progress in global surveillance and response capacity 10 years after severe acute respiratory syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 864–869. doi:10.3201/eid1906.130192
- Brian, D.A., Baric, R.S., 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 287, 1–30.
- Brian, D.A., Hogue, B.G., Kienzle, T.E., 1995. The coronavirus hemagglutinin esterase glycoprotein, in: *The Coronaviridae*. Springer, pp. 165–179.
- Brierley, L., Vonhof, M.J., Olival, K.J., Daszak, P., Jones, K.E., 2016. Quantifying Global Drivers of Zoonotic Bat Viruses: A Process-Based Perspective. *Am. Nat.* 187, E53–64. doi:10.1086/684391
- Broadbent, E.N., Asner, G.P., Keller, M., Knapp, D.E., Oliveira, P.J.C., Silva, J.N., 2008. Forest fragmentation and edge effects from deforestation and selective logging in the Brazilian Amazon. *Biol. Conserv.* 141, 1745–1757.
- Broadhead, J., Izquierdo, R., 2010. Assessment of land use, forest policy and governance in Cambodia. *Phnom Penh Cambodia FAO*.
- Bromham, L., Penny, D., 2003. The modern molecular clock. *Nat. Rev. Genet.* 4, 216–224. doi:10.1038/nrg1020
- Brook, C.E., Dobson, A.P., 2015. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 23, 172–180. doi:10.1016/j.tim.2014.12.004
- Brosset, A., 1990. The migrations of *Pipistrellus nathusii*, in France. Possible implication on the spreading of rabies. *Mamm. Fr.*

- Brunet-Rossinni, A.K., 2004. Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (*Myotis lucifugus*) versus two non-flying mammals. *Mech. Ageing Dev.* 125, 11–20. doi:10.1016/j.mad.2003.09.003
- Brzózka, K., Finke, S., Conzelmann, K.-K., 2006. Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J. Virol.* 80, 2675–2683. doi:10.1128/JVI.80.6.2675-2683.2006
- Bumrungsri, S., Lang, D., Harrower, C., Sripaoraya, E., Kitpipit, K., Racey, P.A., 2013. The dawn bat, *Eonycteris spelaea* Dobson (*Chiroptera: Pteropodidae*) feeds mainly on pollen of economically important food plants in Thailand. *Acta Chiropterologica* 15, 95–104.
- Bumrungsri, S., Sripaoraya, E., Chongsiri, T., Sridith, K., Racey, P.A., 2009. The pollination ecology of durian (*Durio zibethinus*, *Bombacaceae*) in southern Thailand. *J. Trop. Ecol.* 25, 85–92.
- Burkard, C., Verheije, M.H., Wicht, O., Kasteren, S.I. van, Kuppeveld, F.J. van, Haagmans, B.L., Pelkmans, L., Rottier, P.J.M., Bosch, B.J., Haan, C.A.M. de, 2014. Coronavirus Cell Entry Occurs through the Endo-/Lysosomal Pathway in a Proteolysis-Dependent Manner. *PLOS Pathog* 10, e1004502. doi:10.1371/journal.ppat.1004502
- Butler, J.E., Wertz, N., Zhao, Y., Zhang, S., Bao, Y., Bratsch, S., Kunz, T.H., Whitaker Jr., J.O., Schountz, T., 2011. The two suborders of chiropterans have the canonical heavy-chain immunoglobulin (Ig) gene repertoire of eutherian mammals. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 273–284. doi:10.1016/j.dci.2010.08.011
- Calisher, C., Childs, J., Field, H., Schountz, T., Holmes, K., 2006. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Publ. Zoonotics Wildl. Dis.*
- Calisher, C.H., 2015. Viruses in Bats, in: Wang, L.-F., Cowled, C. (Eds.), *Bats and Viruses*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 23–45.
- Cattoli, G., Chu, D.K.W., Peiris, M., 2012. Astrovirus infections in animal mammalian species, in: *Astrovirus Research*. Springer, pp. 135–149.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003. Prevalence of IgG antibody to SARS-associated coronavirus in animal traders--Guangdong Province, China, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 52, 986–987.
- Chakraborty, A.K., Chakravarty, A.K., 1984. Antibody-mediated immune response in the bat, *Pteropus giganteus*. *Dev. Comp. Immunol.* 8, 415–423. doi:10.1016/0145-305X(84)90048-X
- Chakraborty, A.K., Chakravarty, A. k, 1983. Dichotomy of lymphocyte population and cell-mediated immune responses in a fruit bat, *Pteropus giganteus*. *J. Indian Inst. Sci.* 64, 157.
- Chakravarty, A.K., Paul, B.N., 1987. Analysis of suppressor factor in delayed immune responses of a bat, *Pteropus giganteus*. *Dev. Comp. Immunol.* 11, 649–660.
- Chan, R.W.Y., Hemida, M.G., Kayali, G., Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Alnaeem, A., Ali, M.A., Tao, K.P., Ng, H.Y., Chan, M.C.W., Guan, Y., Nicholls, J.M., Peiris, J.S.M., 2014. Tropism and replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus from dromedary camels in the human respiratory tract: an in-vitro and ex-vivo study. *Lancet Respir. Med.* 2, 813–822. doi:10.1016/S2213-2600(14)70158-4
- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.-F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., Borden, E.C., 2003. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 8, 237–249.
- Chen, Y.-N., Phuong, V.N., Chen, H.C., Chou, C.-H., Cheng, H.-C., Wu, C.-H., 2016. Detection of the Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus and Alphacoronavirus in the Bat Population of Taiwan. *Zoonoses Public Health*. doi:10.1111/zph.12271
- Chessel, D., Dufour, A.-B., Thioulouse, J., 2004. The ade4 package - I : One-table methods. *R News* 4, 5–10.
- Cheval, J., Sauvage, V., Frangeul, L., Dacheux, L., Guigon, G., Dumey, N., Pariente, K., Rousseaux, C., Dorange, F., Berthet, N., Brisse, S., Moszer, I., Bourhy, H., Manuguerra, C.J., Lecuit, M., Burguiere, A., Caro, V., Eloit, M., 2011. Evaluation of High-Throughput Sequencing for Identifying Known and Unknown Viruses in Biological Samples. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3268–3275. doi:10.1128/JCM.00850-11

- Chhay, S., 2012. Cambodian bat farms: A review of farming practices and economic value of Lesser Asiatic Yellow House Bat, *Scotophilus kuhlii* (Leach, 1821), in Kandal and Takeo Provinces, Cambodia (thèse de master, non publiée).
- Chheang, S., Bates, P.J., Boughey, K., Csorba, G., Hayes, B., Ith, S., Mould, A., Phauk, S., Furey, N.M., 2013. Further new country records of four bat species (Chiroptera) from Cambodia and a call for information. *Cambodian J. Nat. Hist.* 2, 73–82.
- Chiu Wan, N.G., Wan Yuen, C., Heng Thay CHONG, M.D., Khean Jin, G.O.H., TAN, C.T., 2009. Long-term socioeconomic impact of the Nipah Virus encephalitis outbreak in Bukit Pelanduk, Negeri Sembilan, Malaysia: A mixed methods approach. *Neurol. Asia* 14, 101–107.
- Chomel, B.B., Belotto, A., Meslin, F.X., 2007. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg. Infect. Dis.* 13.
- Christe, P., Arlettaz, R., Vogel, P., 2000. Variation in intensity of a parasitic mite (*Spinturnix myotis*) in relation to the reproductive cycle and immunocompetence of its bat host (*Myotis myotis*). *Ecol. Lett.* 3, 207–212.
- Chu, D.K.W., Chin, A.W.H., Smith, G.J., Chan, K.-H., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Poon, L.L.M., 2010. Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *J. Gen. Virol.* 91, 2457–2462. doi:10.1099/vir.0.022764-0
- Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2008. Novel Astroviruses in Insectivorous Bats. *J. Virol.* 82, 9107–9114. doi:10.1128/JVI.00857-08
- Chua, K.B., 2003. Nipah virus outbreak in Malaysia. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 26, 265–275.
- Chua, K.B., Bellini, W.J., Rota, P.A., Harcourt, B.H., Tamin, A., Lam, S.K., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Zaki, S.R., Shieh, W., Goldsmith, C.S., Gubler, D.J., Roehrig, J.T., Eaton, B., Gould, A.R., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, A.E., Peters, C.J., Anderson, L.J., Mahy, B.W., 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288, 1432–1435.
- Chua, K.B., Chua, B.H., Wang, C.W., 2002. Anthropogenic deforestation, El Niño and the emergence of Nipah virus in Malaysia. *Malays. J. Pathol.* 24, 15–21.
- Chua, K.B., Goh, K.J., Wong, K.T., Kamarulzaman, A., Tan, P.S.K., Ksiazek, T.G., Zaki, S.R., Paul, G., Lam, S.K., Tan, C.T., 1999. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *The Lancet* 354, 1257–1259. doi:10.1016/S0140-6736(99)04299-3
- Cleaveland, S., Haydon, D.T., Taylor, L., 2007. Overviews of Pathogen Emergence: Which Pathogens Emerge, When and Why?, in: Childs, S.R.S.J.E., Mackenzie, P.J.S., Richt, V.M.O.J.A. (Eds.), *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 85–111.
- Constantine, D.G., Emmons, R.W., Woodie, J.D., 1972. Rabies Virus in Nasal Mucosa of Naturally Infected Bats. *Science* 175, 1255–1256. doi:10.1126/science.175.4027.1255
- Cooper, L.N., Sears, K.E., 2013. How to Grow a Bat Wing, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), *Bat Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer New York, pp. 3–20.
- Corman, V.M., Baldwin, H.J., Tateno, A.F., Zerbinati, R.M., Annan, A., Owusu, M., Nkrumah, E.E., Maganga, G.D., Oppong, S., Adu-Sarkodie, Y., Vallo, P., da Silva Filho, L.V.R.F., Leroy, E.M., Thiel, V., van der Hoek, L., Poon, L.L.M., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J.F., 2015. Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats. *J. Virol.* 89, 11858–11870. doi:10.1128/JVI.01755-15
- Corman, V.M., Ithete, N.L., Richards, L.R., Schoeman, M.C., Preiser, W., Drosten, C., Drexler, J.F., 2014. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J. Virol.* 88, 11297–11303. doi:10.1128/JVI.01498-14
- Cowled, C., Baker, M., Tachedjian, M., Zhou, P., Bulach, D., Wang, L.-F., 2011. Molecular characterisation of Toll-like receptors in the black flying fox *Pteropus alecto*. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 7–18. doi:10.1016/j.dci.2010.07.006

- Cowled, C., Baker, M.L., Zhou, P., Tachedjian, M., Wang, L.-F., 2012. Molecular characterisation of RIG-I-like helicases in the black flying fox, *Pteropus alecto*. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 657–664. doi:10.1016/j.dci.2011.11.008
- Cunha, B.A., 2004. Influenza: historical aspects of epidemics and pandemics. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 18, 141–155. doi:10.1016/S0891-5520(03)00095-3
- Currie, S.E., Körtner, G., Geiser, F., 2015. Measuring subcutaneous temperature and differential rates of rewarming from hibernation and daily torpor in two species of bats. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 190, 26–31. doi:10.1016/j.cbpa.2015.08.007
- Daszak, P., Zambrana-Torrel, C., Bogich, T., Fernandez, M., Epstein, J., Murray, K., Hamilton, H., 2012. Interdisciplinary approaches to understanding disease emergence: The past, present, and future drivers of Nipah virus emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.1201243109
- Daughenbaugh, K.F., 2005. The role of VPg in translation of calicivirus RNA.
- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G., 2011. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 11, 1529–1544. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.024
- de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Talbot, P.J., 2012. Family *Coronaviridae*. Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands.
- de Haan, C.A., Haijema, B.J., Masters, P.S., Rottier, P.J., 2008. Manipulation of the coronavirus genome using targeted RNA recombination with interspecies chimeric coronaviruses. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 454, 229–236.
- de Vries, A.A.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., de Groot, R.J., 1997. The Genome Organization of the Nidovirales: Similarities and Differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Semin. Virol.* 8, 33–47. doi:10.1006/smv.1997.0104
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, Sjöström, H., Norén, Laude, H., 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357, 417–420. doi:10.1038/357417a0
- Denison, M.R., 2008. Seeking membranes: positive-strand RNA virus replication complexes. *PLoS Biol.* 6, e270. doi:10.1371/journal.pbio.0060270
- Denison, M.R., Graham, R.L., Donaldson, E.F., Eckerle, L.D., Baric, R.S., 2011. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol.* 8, 270–279.
- Desforges, M., Desjardins, J., Zhang, C., Talbot, P.J., 2013. The Acetyl-Esterase Activity of the Hemagglutinin-Esterase Protein of Human Coronavirus OC43 Strongly Enhances the Production of Infectious Virus. *J. Virol.* 87, 3097–3107. doi:10.1128/JVI.02699-12
- Desforges, M., Le Coupanec, A., Brison, É., Meessen-Pinard, M., Talbot, P.J., 2014. Coronavirus humains respiratoires neuro-invasifs et neurotropes: agents neurovirologiques potentiels. *Virologie* 18, 5–16.
- Desselberger, U., 2000. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. *J. Infect.* 40, 3–15. doi:10.1053/jinf.1999.0624
- Dollfus, C., Beaubois, H., Rougeron, C., 1965. *L'homme, l'air et l'espace*, Editions de l'Illustration. ed. Paris, France.
- Domingo, E., 1994. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. *Evol. Biol. Viruses* 161–184.
- Dong, J., Dong, L., Méndez, E., Tao, Y., 2011. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12681–12686. doi:10.1073/pnas.1104834108
- Doremalen, N. van, Miazgowicz, K.L., Milne-Price, S., Bushmaker, T., Robertson, S., Scott, D., Kinne, J., McLellan, J.S., Zhu, J., Munster, V.J., 2014. Host Species Restriction of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus through Its Receptor, Dipeptidyl Peptidase 4. *J. Virol.* 88, 9220–9232. doi:10.1128/JVI.00676-14

- Drexler, J.F., Corman, V.M., Wegner, T., Tateno, A.F., Zerbinati, R.M., Gloza-Rausch, F., Seebens, A., Müller, M.A., Drosten, C., 2011. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 449–456. doi:10.3201/eid1703.100526
- Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., Corman, V.M., Muth, D., Goettsche, M., Seebens, A., Niedrig, M., Pfefferle, S., Yordanov, S., Zhelyazkov, L., Hermanns, U., Vallo, P., Lukashev, A., Müller, M.A., Deng, H., Herrler, G., Drosten, C., 2010. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 84, 11336–11349. doi:10.1128/JVI.00650-10
- Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B.-J., Jiang, S., 2009. The spike protein of SARS-CoV — a target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 226–236. doi:10.1038/nrmicro2090
- DuBois, R.M., Freiden, P., Marvin, S., Reddivari, M., Heath, R.J., White, S.W., Schultz-Cherry, S., 2013a. Crystal Structure of the Avian Astrovirus Capsid Spike. *J. Virol.* 87, 7853–7863. doi:10.1128/JVI.03139-12
- DuBois, R.M., Freiden, P., Marvin, S., Reddivari, M., Heath, R.J., White, S.W., Schultz-Cherry, S., 2013b. Crystal structure of the avian astrovirus capsid spike. *J. Virol.* 87, 7853–7863. doi:10.1128/JVI.03139-12
- Eckerle, L.D., Becker, M.M., Halpin, R.A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R.L., Baric, R.S., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Denison, M.R., 2010. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog.* 6, e1000896. doi:10.1371/journal.ppat.1000896
- Eckerle, L.D., Lu, X., Sperry, S.M., Choi, L., Denison, M.R., 2007. High Fidelity of Murine Hepatitis Virus Replication Is Decreased in nsp14 Exoribonuclease Mutants. *J. Virol.* 81, 12135–12144. doi:10.1128/JVI.01296-07
- El Najjar, F., Lampe, L., Baker, M.L., Wang, L.-F., Dutch, R.E., 2015. Analysis of cathepsin and furin proteolytic enzymes involved in viral fusion protein activation in cells of the bat reservoir host. *PloS One* 10, e0115736. doi:10.1371/journal.pone.0115736
- Enserink, M., 2000. Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. *Science* 289, 518–519.
- Escaffre, O., Borisevich, V., Rockx, B., 2013. Pathogenesis of Hendra and Nipah virus infection in humans. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7, 308–311.
- Escalera-Zamudio, M., Zepeda-Mendoza, M.L., Loza-Rubio, E., Rojas-Anaya, E., Méndez-Ojeda, M.L., Arias, C.F., Greenwood, A.D., 2015. The evolution of bat nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Mol. Ecol.* 24, 5899–5909. doi:10.1111/mec.13431
- Escobar, L.E., Restif, O., Yung, V., Favi, M., Pons, D.J., Medina-Vogel, G., 2015. Spatial and temporal trends of bat-borne rabies in Chile. *Epidemiol. Infect.* 143, 1486–1494. doi:10.1017/S095026881400226X
- Etienne, L., Peeters, M., 2010. Origine du VIH, une réussite émergente. *Virologie* 14, 171–184. doi:10.1684/vir.2010.0307
- Fenolio, D.B., Graening, G.O., Collier, B.A., Stout, J.F., 2006. Coprophagy in a cave-adapted salamander; the importance of bat guano examined through nutritional and stable isotope analyses. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 273, 439–443. doi:10.1098/rspb.2005.3341
- Fenton, M.B., 2013. Evolution of Echolocation, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), *Bat Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer New York, pp. 47–70.
- Finkbeiner, S.R., Holtz, L.R., 2012. New Human Astroviruses, in: Schultz-Cherry, S. (Ed.), *Astrovirus Research*. Springer New York, pp. 119–133.
- Fleming, T.H., Eby, P., Kunz, T.H., Fenton, M.B., 2003. Ecology of bat migration. ResearchGate.
- Fleming, T.H., Geiselman, C., Kress, W.J., 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Ann. Bot.* 104, 1017–1043. doi:10.1093/aob/mcp197
- Florens, F.B.V., 2015. Flying foxes face cull despite evidence. *Science* 350, 1325–1326. doi:10.1126/science.350.6266.1325-a

- Fontanet, A., 2007. [Lessons from SARS]. Presse Médicale Paris Fr. 1983 36, 299–302.
doi:10.1016/j.lpm.2006.12.005
- Fortin, M.-J., Keitt, T.H., Maurer, B.A., Taper, M.L., Kaufman, D.M., Blackburn, T.M., 2005. Species' Geographic Ranges and Distributional Limits: Pattern Analysis and Statistical Issues. *Oikos* 7–17.
- Fox, B.A., Sheppard, P.O., O'Hara, P.J., 2009. The Role of Genomic Data in the Discovery, Annotation and Evolutionary Interpretation of the Interferon-Lambda Family. *PLOS ONE* 4, e4933.
doi:10.1371/journal.pone.0004933
- Fujii, H., Watanabe, S., Yamane, D., Ueda, N., Iha, K., Taniguchi, S., Kato, K., Tohya, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., Akashi, H., 2010. Functional analysis of *Rousettus aegyptiacus* "signal transducer and activator of transcription 1" (STAT1). *Dev. Comp. Immunol.* 34, 598–602.
doi:10.1016/j.dci.2010.01.004
- Furey, N.M., Racey, P.A., 2016. Conservation Ecology of Cave Bats, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 463–500.
- Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J., 2001. Coronavirus Spike Proteins in Viral Entry and Pathogenesis. *Virology* 279, 371–374. doi:10.1006/viro.2000.0757
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C., 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* CABIOS 12, 543–548.
doi:10.1093/bioinformatics/12.6.543
- Gao, J., Wu, H., Shi, X., Huo, Z., Zhang, J., Liang, Z., 2016. Comparison of Next-Generation Sequencing, Quantitative PCR, and Sanger Sequencing for Mutation Profiling of EGFR, KRAS, PIK3CA and BRAF in Clinical Lung Tumors. *Clin. Lab.* 62, 689–696.
- Gay, N., Olival, K.J., Bumrungsri, S., Siriaronrat, B., Bourgarel, M., Morand, S., 2014. Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: Fragmentation of area distribution matters. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 161–170. doi:10.1016/j.ijppaw.2014.06.003
- Gayer, M., Legros, D., Formenty, P., Connolly, M.A., 2007. Conflict and emerging infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1625–1631.
- Ge, X.-Y., Li, J.-L., Yang, X.-L., Chmura, A.A., Zhu, G., Epstein, J.H., Mazet, J.K., Hu, B., Zhang, W., Peng, C., Zhang, Y.-J., Luo, C.-M., Tan, B., Wang, N., Zhu, Y., Crameri, G., Zhang, S.-Y., Wang, L.-F., Daszak, P., Shi, Z.-L., 2013. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature advance online publication*. doi:10.1038/nature12711
- Geiser, F., Brigham, R.M., 2000. Torpor, thermal biology, and energetics in Australian long-eared bats (*Nyctophilus*). *J. Comp. Physiol. B* 170, 153–162. doi:10.1007/s003600050270
- Geiser, F., Coburn, D.K., Kourtner, G., Law, B.S., 1996. Thermoregulation, energy metabolism, and torpor in blossom-bats, *Syconycteris australis* (Megachiroptera). *J. Zool.* 239, 583–590.
doi:10.1111/j.1469-7998.1996.tb05944.x
- Geiser, F., Ruf, T., 1995. Hibernation versus Daily Torpor in Mammals and Birds: Physiological Variables and Classification of Torpor Patterns. *Physiol. Zool.* 68, 935–966.
- Geiser, F., Stawski, C., 2011. Hibernation and Torpor in Tropical and Subtropical Bats in Relation to Energetics, Extinctions, and the Evolution of Endothermy. *Integr. Comp. Biol.* i cr042.
doi:10.1093/icb/icr042
- George, D.B., Webb, C.T., Farnsworth, M.L., O'Shea, T.J., Bowen, R.A., Smith, D.L., Stanley, T.R., Ellison, L.E., Rupprecht, C.E., 2011. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10208–10213.
- Gibbs, E.P.J., 2014. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. *Vet. Rec.* 174, 85–91. doi:10.1136/vr.g143
- Gierer, S., Bertram, S., Kaup, F., Wrensch, F., Heurich, A., Krämer-Kühl, A., Welsch, K., Winkler, M., Meyer, B., Drosten, C., Dittmer, U., Hahn, T. von, Simmons, G., Hofmann, H., Pöhlmann, S., 2013. The Spike Protein of the Emerging Betacoronavirus EMC Uses a Novel Coronavirus Receptor for Entry, Can Be Activated by TMPRSS2, and Is Targeted by Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* 87, 5502–5511. doi:10.1128/JVI.00128-13

- Gillieson, D., 1996. *Caves: Processes, Development and Management*. Blackwells Publishers, Oxford, UK.
- Glasser, J.W., Hupert, N., McCauley, M.M., Hatchett, R., 2011. Modeling and public health emergency responses: lessons from SARS. *Epidemics* 3, 32–37. doi:10.1016/j.epidem.2011.01.001
- Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Göttische, M., Panning, M., Drexler, J.F., Petersen, N., Annan, A., Grywna, K., Müller, M., Pfefferle, S., Drosten, C., 2008. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 626–631. doi:10.3201/eid1404.071439
- Goffard, A., Demanche, C., Arthur, L., Pinçon, C., Michaux, J., Dubuisson, J., 2015. Alphacoronaviruses Detected in French Bats Are Phylogeographically Linked to Coronaviruses of European Bats. *Viruses* 7, 6279–6290. doi:10.3390/v7122937
- Gonzalez-Terrazas, T.P., Medellin, R.A., Knörnschild, M., Tschapka, M., 2012. Morphological specialization influences nectar extraction efficiency of sympatric nectar-feeding bats. *J. Exp. Biol.* 215, 3989–3996. doi:10.1242/jeb.068494
- Gough, R.E., Borland, E.D., Keymer, I.F., Stuart, J.C., 1985. An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. *Avian Pathol. J. WVPA* 14, 227–236. doi:10.1080/03079458508436224
- Gould, E., 1978. Foraging Behavior of Malaysian Nectar-Feeding Bats. *Biotropica* 10, 184–193. doi:10.2307/2387904
- Goya, F. de, 1903. *Los desastres de la guerra: colección de ochenta laminas inventadas y grabadas al agua-fuerte*. Real Academia de Bellas Artes de San Fernando.
- Grace, D., Gilbert, J., Lapar, M.L., Unger, F., Fèvre, S., Nguyen-Viet, H., Schelling, E., 2011. Zoonotic emerging infectious disease in selected countries in Southeast Asia: insights from ecohealth. *EcoHealth* 8, 55–62. doi:10.1007/s10393-010-0357-3
- Graham, R.L., Baric, R.S., 2010. Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. *J. Virol.* 84, 3134–3146. doi:10.1128/JVI.01394-09
- Graham, R.L., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2013. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro3143
- Groneberg, D.A., Poutanen, S.M., Low, D.E., Lode, H., Welte, T., Zabel, P., 2005. Treatment and vaccines for severe acute respiratory syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 5, 147–155. doi:10.1016/S1473-3099(05)01307-1
- Groseth, A., Feldmann, H., Strong, J.E., 2007. The ecology of Ebola virus. *Trends Microbiol.* 15, 408–416. doi:10.1016/j.tim.2007.08.001
- Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., Butt, K.M., Wong, K.L., Chan, K.W., Lim, W., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S.M., Poon, L.L.M., 2003. Isolation and Characterization of Viruses Related to the SARS Coronavirus from Animals in Southern China. *Science* 302, 276–278. doi:10.1126/science.1087139
- Guix, S., Bosch, A., Pintó, R.M., 2012. *Astrovirus Taxonomy*, in: Schultz-Cherry, S. (Ed.), *Astrovirus Research*. Springer New York, pp. 97–118.
- Gurley, E.S., Montgomery, J.M., Hossain, M.J., Bell, M., Azad, A.K., Islam, M.R., Molla, M.A.R., Carroll, D.S., Ksiazek, T.G., Rota, P.A., Lowe, L., Comer, J.A., Rollin, P., Czub, M., Grolla, A., Feldmann, H., Luby, S.P., Woodward, J.L., Breiman, R.F., 2007. Person-to-Person Transmission of Nipah Virus in a Bangladeshi Community. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1031–1037. doi:10.3201/eid1307.061128
- Haagmans, B.L., Al Dhahiry, S.H.S., Reusken, C.B.E.M., Raj, V.S., Galiano, M., Myers, R., Godeke, G.-J., Jonges, M., Farag, E., Diab, A., Ghobashy, H., Alhajri, F., Al-Thani, M., Al-Marri, S.A., Al Romaini, H.E., Al Khal, A., Bermingham, A., Osterhaus, A.D.M.E., AlHajri, M.M., Koopmans, M.P.G., 2014. Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *Lancet Infect. Dis.* 14, 140–145. doi:10.1016/S1473-3099(13)70690-X
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., Sharp, P.M., 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607–614.

- Halpin, K., Young, P.L., Field, H.E., Mackenzie, J.S., 2000. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.* 81, 1927–1932.
- Hamre, D., Procknow, J.J., 1966. A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Exp. Biol. Med.* 121, 190–193. doi:10.3181/00379727-121-30734
- Han, H.-J., Wen, H., Zhou, C.-M., Chen, F.-F., Luo, L.-M., Liu, J., Yu, X.-J., 2015. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* 205, 1–6. doi:10.1016/j.virusres.2015.05.006
- Hatten, B.A., Lutskus, J.H., Sulkin, S.E., 1973. A serologic comparison of bat complements. *J. Exp. Zool.* 186, 193–206. doi:10.1002/jez.1401860210
- Hayman, D.T.S., 2015. Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. *Proc. Biol. Sci.* 282, 20142591. doi:10.1098/rspb.2014.2591
- He, J.-F., Peng, G.-W., Min, J., Yu, D.-W., Liang, W.-J., Zhang, S.-Y., Xu, R.-H., Zheng, H.-Y., Wu, X.-W., Xu, J., Wang, Z.-H., Fang, L., Zhang, X., Li, H., Yan, X.-G., Lu, J.-H., Hu, Z.-H., Huang, J.-C., Wan, Z.-Y., Hou, J.-L., Lin, J.-Y., Song, H.-D., Wang, S.-Y., Zhou, X.-J., Zhang, G.-W., Gu, B.-W., Zheng, H.-J., Zhang, X.-L., He, M., Zheng, K., Wang, B.-F., Fu, G., Wang, X.-N., Chen, S.-J., Chen, Z., Hao, P., Tang, H., Ren, S.-X., Zhong, Y., Guo, Z.-M., Liu, Q., Miao, Y.-G., Kong, X.-Y., He, W.-Z., Li, Y.-X., Wu, C.-I., Zhao, G.-P., Chiu, R.W.K., Chim, S.S.C., Tong, Y., Chan, P.K.S., Tam, J.S., Lo, Y.M.D., 2004. Molecular Evolution of the SARS Coronavirus During the Course of the SARS Epidemic in China. *Science* 303, 1666–1669. doi:10.1126/science.1092002
- He, R., Leeson, A., Andonov, A., Li, Y., Bastien, N., Cao, J., Osiowy, C., Dobie, F., Cutts, T., Ballantine, M., Li, X., 2003. Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 870–876.
- Herreid, C.F., 1963. Temperature Regulation and Metabolism in Mexican Freetail Bats. *Science* 142, 1573–1574. doi:10.1126/science.142.3599.1573
- Hiryu, S., Bates, M.E., Simmons, J.A., Riquimaroux, H., 2010. FM echolocating bats shift frequencies to avoid broadcast-echo ambiguity in clutter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7048–7053.
- Hock, R.J., 1951. The Metabolic Rates and Body Temperatures of Bats. *Biol. Bull.* 101, 289–299. doi:10.2307/1538547
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B., Pöhlmann, S., Griffin, D.E., 2005. Human Coronavirus NL63 Employs the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor for Cellular Entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7988–7993.
- Holland, R.A., Waters, D.A., Rayner, J.M.V., 2004. Echolocation signal structure in the Megachiropteran bat *Rousettus aegyptiacus* Geoffroy 1810. *J. Exp. Biol.* 207, 4361–4369. doi:10.1242/jeb.01288
- Holmes, E.C., 2009. *The Evolution and Emergence of RNA Viruses*. Oxford University Press.
- Holmes, E.C., Drummond, A.J., 2007. The Evolutionary Genetics of Viral Emergence, in: Childs, S.R.S.J.E., Mackenzie, P.J.S., Richt, V.M.O.J.A. (Eds.), *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 51–66.
- Horby, P.W., Pfeiffer, D., Oshitani, H., 2013. Prospects for emerging infections in East and southeast Asia 10 years after severe acute respiratory syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 853–860. doi:10.3201/eid1906.121783
- Hsu, V.P., Hossain, M.J., Parashar, U.D., Ali, M.M., Ksiazek, T.G., Kuzmin, I., Niezgodna, M., Rupprecht, C., Bresee, J., Breiman, R.F., 2004. Nipah Virus Encephalitis Reemergence, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2082–2087. doi:10.3201/eid1012.040701
- Hu, B., Chmura, A.A., Li, J., Zhu, G., Desmond, J.S., Zhang, Y., Zhang, W., Epstein, J.H., Daszak, P., Shi, Z., 2014. Detection of diverse novel astroviruses from small mammals in China. *J. Gen. Virol.* vir.0.067686-0. doi:10.1099/vir.0.067686-0
- Hughes, J.M., Wilson, M.E., Luby, S.P., Gurley, E.S., Hossain, M.J., 2009. Transmission of Human Infection with Nipah Virus. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1743–1748. doi:10.1086/647951
- Huraux, J.-M., 2003. *Traité de virologie médicale*. De Boeck Secundair.
- Huynh, J., Li, S., Yount, B., Smith, A., Sturges, L., Olsen, J.C., Nagel, J., Johnson, J.B., Agnihothram, S., Gates, J.E., Frieman, M.B., Baric, R.S., Donaldson, E.F., 2012. Evidence Supporting a Zoonotic

- Origin of Human Coronavirus Strain NL63. *J. Virol.* 86, 12816–12825. doi:10.1128/JVI.00906-12
- Iha, K., Omatsu, T., Watanabe, S., Ueda, N., Taniguchi, S., Fujii, H., Ishii, Y., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., 2010. Molecular cloning and expression analysis of bat toll-like receptors 3, 7 and 9. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 72, 217–220.
- Iha, K., Omatsu, T., Watanabe, S., Ueda, N., Taniguchi, S., Fujii, H., Ishii, Y., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., 2009. Molecular cloning and sequencing of the cDNAs encoding the bat interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, and tumor necrosis factor-alpha. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 71, 1691–1695.
- Imada, T., Yamaguchi, S., Mase, M., Tsukamoto, K., Kubo, M., Morooka, A., 2000. Avian Nephritis Virus (ANV) as a New Member of the Family Astroviridae and Construction of Infectious ANV cDNA. *J. Virol.* 74, 8487–8493. doi:10.1128/JVI.74.18.8487-8493.2000
- Islam, M.S., Sazzad, H.M.S., Satter, S.M., Sultana, S., Hossain, M.J., Hasan, M., Rahman, M., Campbell, S., Cannon, D.L., Ströher, U., Daszak, P., Luby, S.P., Gurley, E.S., 2016. Nipah Virus Transmission from Bats to Humans Associated with Drinking Traditional Liquor Made from Date Palm Sap, Bangladesh, 2011–2014. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 664–670. doi:10.3201/eid2204.151747
- IUCN, 2016. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2.1 <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 August 2016 [WWW Document]. UICN. URL <http://www.iucn.org/fr> (accessed 8.11.16).
- Janardhana, V., Tachedjian, M., Cramer, G., Cowled, C., Wang, L.-F., Baker, M.L., 2012. Cloning, expression and antiviral activity of IFN γ from the Australian fruit bat, *Pteropus alecto*. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 610–618. doi:10.1016/j.dci.2011.11.001
- Johnson, F.B., 1990. Transport of viral specimens. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 120–131. doi:10.1128/CMR.3.2.120
- Jonassen, C.M., Jonassen, T.Ø., Saif, Y.M., Snodgrass, D.R., Ushijima, H., Shimizu, M., Grinde, B., 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J. Gen. Virol.* 82, 1061–1067. doi:10.1099/0022-1317-82-5-1061
- Jones, B.A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M.Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J., Pfeiffer, D.U., 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8399–8404. doi:10.1073/pnas.1208059110
- Jones, G., Teeling, E.C., 2006. The evolution of echolocation in bats. *Trends Ecol. Evol.* 21, 149–156. doi:10.1016/j.tree.2006.01.001
- Jones, K.E., Bininda-Emonds, O.R.P., Gittleman, J.L., 2005. Bats, Clocks, and Rocks: Diversification Patterns in Chiroptera. *Evolution* 59, 2243–2255. doi:10.1111/j.0014-3820.2005.tb00932.x
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. doi:10.1038/nature06536
- Jones, K.E., Purvis, A., MacLARNON, A., Bininda-Emonds, O.R.P., Simmons, N.B., 2002. A phylogenetic supertree of the bats (*Mammalia: Chiroptera*). *Biol. Rev.* 77, 223–259. doi:10.1017/S1464793101005899
- Jones, M.E.B., Schuh, A.J., Amman, B.R., Sealy, T.K., Zaki, S.R., Nichol, S.T., Towner, J.S., 2015. Experimental Inoculation of Egyptian Rousette Bats (*Rousettus aegyptiacus*) with Viruses of the Ebolavirus and Marburgvirus Genera. *Viruses* 7, 3420–3442. doi:10.3390/v7072779
- Kalka, M.B., Smith, A.R., Kalko, E.K.V., 2008. Bats Limit Arthropods and Herbivory in a Tropical Forest. *Science* 320, 71–71. doi:10.1126/science.1153352
- Karlsson, E.A., Small, C.T., Freiden, P., Feeroz, M.M., Matsen, F.A., San, S., Hasan, M.K., Wang, D., Jones-Engel, L., Schultz-Cherry, S., 2015. Non-Human Primates Harbor Diverse Mammalian and Avian Astroviruses Including Those Associated with Human Infections. *PLoS Pathog.* 11, e1005225. doi:10.1371/journal.ppat.1005225
- Kelm, D.H., Wiesner, K.R., Herversen, O. von, 2008. Effects of Artificial Roosts for Frugivorous Bats on Seed Dispersal in a Neotropical Forest Pasture Mosaic. *Conserv. Biol.* 22, 733–741. doi:10.1111/j.1523-1739.2008.00925.x

- Khasnis, A.A., Nettleman, M.D., 2005. Global Warming and Infectious Disease. Arch. Med. Res., Infectious Diseases: Revisiting Past Problems and Addressing Future Challenges Infectious Diseases: Revisiting Past Problems and Addressing Future Challenges 36, 689–696. doi:10.1016/j.arcmed.2005.03.041
- Kim, D.-W., Kim, Y.-J., Park, S.H., Yun, M.-R., Yang, J.-S., Kang, H.J., Han, Y.W., Lee, H.S., Man Kim, H., Kim, H., Kim, A.-R., Heo, D.R., Kim, S.J., Jeon, J.H., Park, D., Kim, J.A., Cheong, H.-M., Nam, J.-G., Kim, K., Kim, S.S., 2016. Variations in Spike Glycoprotein Gene of MERS-CoV, South Korea, 2015. Emerg. Infect. Dis. 22, 100–104. doi:10.3201/eid2201.151055
- Kim, H.K., Yoon, S.-W., Kim, D.-J., Koo, B.-S., Noh, J.Y., Kim, J.H., Choi, Y.G., Na, W., Chang, K.-T., Song, D., Jeong, D.G., 2016. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome-Like, Middle East Respiratory Syndrome-Like Bat Coronaviruses and Group H Rotavirus in Faeces of Korean Bats. Transbound. Emerg. Dis. 63, 365–372. doi:10.1111/tbed.12515
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Lefkowitz, E., Carstens, E.B., 2012. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier.
- Klingbeil, B.T., Willig, M.R., 2009. Guild-specific responses of bats to landscape composition and configuration in fragmented Amazonian rainforest. J. Appl. Ecol. 46, 203–213. doi:10.1111/j.1365-2664.2008.01594.x
- Kluger, M.J., Kozak, W., Conn, C.A., Leon, L.R., Soszynski, D., 1998. Role of Fever in Disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 856, 224–233. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08329.x
- Koci, M.D., Seal, B.S., Schultz-Cherry, S., 2000. Molecular characterization of an avian astrovirus. J. Virol. 74, 6173–6177.
- Kopecky-Bromberg, S.A., Martínez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R.A., Palese, P., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. J. Virol. 81, 548–557. doi:10.1128/JVI.01782-06
- Ksiazek, T.G., Rota, P.A., Rollin, P.E., 2011. A review of Nipah and Hendra viruses with an historical aside. Virus Res. 162, 173–183. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.026
- Kunz, T.H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., Fleming, T.H., 2011. Ecosystem services provided by bats. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1223, 1–38. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x
- Kunz, T.H., Fenton, M.B., 2005. Bat Ecology. University of Chicago Press.
- Kunz, T.H., Jr, J.O.W., Wadanolli, M.D., 1995. Dietary energetics of the insectivorous Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) during pregnancy and lactation. Oecologia 101, 407–415. doi:10.1007/BF00329419
- Laaser, U., Brand, H., 2014. Global health in the 21st century. Glob. Health Action 7, 23694.
- Lack, J.B., Roehrs, Z.P., Stanley, C.E., Ruedi, M., Bussche, R.A.V.D., 2010. Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). J. Mammal. 91, 976–992. doi:10.1644/09-MAMM-A-192.1
- Lambrechts, L., Scott, T.W., Gubler, D.J., 2010. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. PLOS Negl Trop Dis 4, e646. doi:10.1371/journal.pntd.0000646
- Lau, S.K.P., Lee, P., Tsang, A.K.L., Yip, C.C.Y., Tse, H., Lee, R.A., So, L.-Y., Lau, Y.-L., Chan, K.-H., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., 2011. Molecular Epidemiology of Human Coronavirus OC43 Reveals Evolution of Different Genotypes over Time and Recent Emergence of a Novel Genotype due to Natural Recombination. J. Virol. 85, 11325–11337. doi:10.1128/JVI.05512-11
- Lau, S.K.P., Li, K.S.M., Tsang, A.K.L., Lam, C.S.F., Ahmed, S., Chen, H., Chan, K.-H., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., 2013. Genetic Characterization of Betacoronavirus Lineage C Viruses in Bats Reveals Marked Sequence Divergence in the Spike Protein of *Pipistrellus* Bat Coronavirus HKU5 in Japanese Pipistrelle: Implications for the Origin of the Novel Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. J. Virol. 87, 8638–8650. doi:10.1128/JVI.01055-13
- Lau, S.K.P., Li, K.S.M., Tsang, A.K.L., Shek, C.-T., Wang, M., Choi, G.K.Y., Guo, R., Wong, B.H.L., Poon, R.W.S., Lam, C.S.F., Wang, S.Y.H., Fan, R.Y.Y., Chan, K.-H., Zheng, B.-J., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., 2012. Recent transmission of a novel alphacoronavirus, bat coronavirus HKU10, from

- Leschenault's rousettes to pomona leaf-nosed bats: first evidence of interspecies transmission of coronavirus between bats of different suborders. *J. Virol.* 86, 11906–11918. doi:10.1128/JVI.01305-12
- Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Wong, B.H.L., Wong, S.S.Y., Leung, S.-Y., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14040–14045. doi:10.1073/pnas.0506735102
- Laude, H. Institut N. de la R.A., 2003. Cellular and molecular biology of coronaviruses. *Bull. Académie Vét. Fr.*
- Laude, H., Rasschaert, D., Delmas, B., Eleouët, J.-F., 1998. Le coronavirus respiratoire porcin PRCV : un virus émergent pas comme les autres. *Virologie* 2, 305–16.
- Lauring, A.S., Andino, R., 2010. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLOS Pathog* 6, e1001005. doi:10.1371/journal.ppat.1001005
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25.
- Lederberg, J., Shope, R.E., Oaks Jr, S.C., 1992. *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States.* National Academies Press.
- Lee, J.-W., McKibbin, W.J., 2004. Globalization and Disease: The Case of SARS. *Asian Econ. Pap.* 3, 113–131. doi:10.1162/1535351041747932
- Lee, T.M., Sigouin, A., Pinedo-Vasquez, M., Nasi, R., 2014. The harvest of wildlife for bushmeat and traditional medicine in East, South and Southeast Asia: Current knowledge base, challenges, opportunities and areas for future research. Center for International Forestry Research (CIFOR), Bogor, Indonesia.
- Leelapaibul, W., Bumrungsri, S., Pattanawiboon, A., 2005. Diet of wrinkle-lipped free-tailed bat (*Tadarida plicata* Buchannan, 1800) in central Thailand: insectivorous bats potentially act as biological pest control agents. *Acta Chiropterologica* 7.
- Leroy, E., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J., Gonzalez, J.-P., Swanepoel, R., 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438, 575–576. doi:10.1038/438575a
- Leroy, E.M., Epelboin, A., Mondonge, V., Pourrut, X., Gonzalez, J.-P., Muyembe-Tamfum, J.-J., Formenty, P., 2009. Human Ebola Outbreak Resulting from Direct Exposure to Fruit Bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 9, 723–728. doi:10.1089/vbz.2008.0167
- Li, B., Ge, J., Li, Y., 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* 365, 166–172.
- Li, G., Wang, J., Rossiter, S.J., Jones, G., Cotton, J.A., Zhang, S., 2008. The hearing gene Prestin reunites echolocating bats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 13959–13964. doi:10.1073/pnas.0802097105
- Li, J., Zhang, G., Cheng, D., Ren, H., Qian, M., Du, B., 2015. Molecular characterization of RIG-I, STAT-1 and IFN-beta in the horseshoe bat. *Gene* 561, 115–123. doi:10.1016/j.gene.2015.02.013
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., Delwart, E., 2010. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J. Virol.* 84, 6955–6965. doi:10.1128/JVI.00501-10
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., Farzan, M., 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454. doi:10.1038/nature02145
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., Zhang, S., Wang, L.-F., 2005. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science* 310, 676–679. doi:10.1126/science.1118391

- Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J.H., Moore, M.J., Luo, S., Wong, S.-K., Huang, I.-C., Xu, K., Vasilieva, N., Murakami, A., He, Y., Marasco, W.A., Guan, Y., Choe, H., Farzan, M., 2005. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24, 1634–1643. doi:10.1038/sj.emboj.7600640
- Liu, C., Tang, J., Ma, Y., Liang, X., Yang, Y., Peng, G., Qi, Q., Jiang, S., Li, J., Du, L., Li, F., 2015. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.00430-15
- Looi, L.-M., Chua, K.-B., 2007. Lessons from the Nipah virus outbreak in Malaysia. *Malays. J. Pathol.* 29, 63–67.
- Lu, G., Wang, Q., Gao, G.F., 2015. Bat-to-human: spike features determining “host jump” of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends Microbiol.* 23, 468–478. doi:10.1016/j.tim.2015.06.003
- Luby, S.P., Rahman, M., Hossain, M.J., Blum, L.S., Husain, M.M., Gurley, E., Khan, R., Ahmed, B.-N., Rahman, S., Nahar, N., Kenah, E., Comer, J.A., Ksiazek, T.G., 2006. Foodborne Transmission of Nipah Virus, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1888–1894. doi:10.3201/eid1212.060732
- Lukashov, V.V., Goudsmit, J., 2002. Evolutionary relationships among *Astroviridae*. *J. Gen. Virol.* 83, 1397–1405. doi:10.1099/0022-1317-83-6-1397
- Maas, B., Clough, Y., Tscharntke, T., 2013. Bats and birds increase crop yield in tropical agroforestry landscapes. *Ecol. Lett.* 16, 1480–1487. doi:10.1111/ele.12194
- Maas, B., Karp, D.S., Bumrungsri, S., Darras, K., Gonthier, D., Huang, J.C.-C., Lindell, C.A., Maine, J.J., Mestre, L., Michel, N.L., Morrison, E.B., Perfecto, I., Philpott, S.M., Şekercioğlu, Ç.H., Silva, R.M., Taylor, P.J., Tscharntke, T., Van Bael, S.A., Whelan, C.J., Williams-Guillén, K., 2015. Bird and bat predation services in tropical forests and agroforestry landscapes. *Biol. Rev.* n/a-n/a. doi:10.1111/brv.12211
- Mackenzie, J.S., Field, H.E., 2004. Emerging encephalitogenic viruses: lyssaviruses and henipaviruses transmitted by frugivorous bats. *Arch. Virol. Suppl.* 97–111.
- Marshall, A.G., 1985. Old world phytophagous bats (Megachiroptera) and their food plants: a survey. *Zool. J. Linn. Soc.* 83, 351–369.
- Marshall, A.G., 1983. Bats, flowers and fruit: evolutionary relationships in the Old World. *Biol. J. Linn. Soc.* 20, 115–135. doi:10.1111/j.1095-8312.1983.tb01593.x
- Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193–292. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3
- Matsui, S.M., Herrmann, J.E., 2003. Astroviruses, in: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Mayer, F., Brunner, A., 2007. Non-neutral evolution of the major histocompatibility complex class II gene DRB1 in the sac-winged bat *Saccopteryx bilineata*. *Heredity* 99, 257–264. doi:10.1038/sj.hdy.6800989
- Mayer, J.D., 2000. Geography, ecology and emerging infectious diseases. *Soc. Sci. Med.* 50, 937–952. doi:10.1016/S0277-9536(99)00346-9
- McMurray, D.N., Thomas, M.E., 1979. Cell-Mediated Immunity in Two Species of Bats. *J. Mammal.* 60, 576–581. doi:10.2307/1380099
- McNab, B.K., 1989. Temperature regulation and rate of metabolism in three Bornean bats. *J. Mammal.* 70, 153–161.
- Meliopoulos, V.A., Kayali, G., Burnham, A., Oshansky, C.M., Thomas, P.G., Gray, G.C., Beck, M.A., Schultz-Cherry, S., 2014. Detection of Antibodies against Turkey Astrovirus in Humans. *PLOS ONE* 9, e96934. doi:10.1371/journal.pone.0096934
- Meliopoulos, V., Schultz-Cherry, S., 2012. Astrovirus Pathogenesis, in: Schultz-Cherry, S. (Ed.), *Astrovirus Research*. Springer New York, pp. 65–77.
- Memish, Z.A., Cotten, M., Meyer, B., Watson, S.J., Alsahafi, A.J., Al Rabeeah, A.A., Corman, V.M., Sieberg, A., Makhdoom, H.Q., Assiri, A., Al Masri, M., Aldabbagh, S., Bosch, B.-J., Beer, M., Müller, M.A., Kellam, P., Drosten, C., 2014. Human Infection with MERS Coronavirus after

- Exposure to Infected Camels, Saudi Arabia, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1012–1015. doi:10.3201/eid2006.140402
- Mendenhall, I.H., Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., 2015a. Ecological Drivers of Virus Evolution: Astrovirus as a Case Study. *J. Virol.* 89, 6978–6981. doi:10.1128/JVI.02971-14
- Mendenhall, I.H., Yaung, K.N., Joyner, P.H., Keatts, L., Borthwick, S., Neves, E.S., San, S., Gilbert, M., Smith, G.J., 2015b. Detection of a novel astrovirus from a black-naped monarch (*Hypothymis azurea*) in Cambodia. *Virol. J.* 12, 182. doi:10.1186/s12985-015-0413-2
- Méndez, E., Fernández-Luna, T., López, S., Méndez-Toss, M., Arias, C.F., 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J. Virol.* 76, 7996–8002.
- Méndez, E., Muñoz-Yañez, C., Sánchez-San Martín, C., Aguirre-Crespo, G., Baños-Lara, M. del R., Gutierrez, M., Espinosa, R., Acevedo, Y., Arias, C.F., López, S., 2014. Characterization of human astrovirus cell entry. *J. Virol.* 88, 2452–2460. doi:10.1128/JVI.02908-13
- Méndez, E., Murillo, A., Velázquez, R., Burnham, A., Arias, C.F., 2012. Replication cycle of astroviruses, in: *Astrovirus Research*. Springer, pp. 19–45.
- Merianos, A., Peiris, M., 2005. International health regulations (2005). *The Lancet* 366, 1249–1251.
- Mickleburgh, S.P., Hutson, A.M., Racey, P.A., 2002. A review of the global conservation status of bats. *Oryx* 36, 18–34. doi:10.1017/S0030605302000054
- Mildenstein, T., Tanshi, I., Racey, P.A., 2016. Exploitation of Bats for Bushmeat and Medicine, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 325–375.
- Miller, S., Krijnse-Locker, J., 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 363–374. doi:10.1038/nrmicro1890
- Miller-Butterworth, C.M., Murphy, W.J., O'Brien, S.J., Jacobs, D.S., Springer, M.S., Teeling, E.C., 2007. A Family Matter: Conclusive Resolution of the Taxonomic Position of the Long-Fingered Bats, *Miniopterus*. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1553–1561. doi:10.1093/molbev/msm076
- Millet, J.K., Whittaker, G.R., 2015. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 202, 120–134. doi:10.1016/j.virusres.2014.11.021
- Millet, J.K., Whittaker, G.R., 2014. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 15214–15219. doi:10.1073/pnas.1407087111
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A.E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., Ziebuhr, J., 2006. Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5108–5113. doi:10.1073/pnas.0508200103
- Miyoshi-Akiyama, T., Ishida, I., Fukushi, M., Yamaguchi, K., Matsuoka, Y., Ishihara, T., Tsukahara, M., Hatakeyama, S., Itoh, N., Morisawa, A., Yoshinaka, Y., Yamamoto, N., Lianfeng, Z., Chuan, Q., Kirikae, T., Sasazuki, T., 2011. Fully human monoclonal antibody directed to proteolytic cleavage site in severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus S protein neutralizes the virus in a rhesus macaque SARS model. *J. Infect. Dis.* 203, 1574–1581. doi:10.1093/infdis/jir084
- Mohd-Azlan, J., Ahmad, Z.A.M., Kunz, T.H., 2001. Distribution, relative abundance, and conservation status of the large flying fox, *Pteropus vampyrus*, in peninsular Malaysia. *Acta Chiropterologica* 3, 149–162.
- Mondul, A.M., Krebs, J.W., Childs, J.E., 2003. Trends in national surveillance for rabies among bats in the United States (1993-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 633–639.
- Monroe, S., Carter, M., Herrmann, M., Kurtz JB, Matsui SM. *Astroviridae*. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrail SA, Jarvis AW, Martielli GP, Mayo MA, Summers MD, editors., 1995. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses, sixth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Wien, Austria: Springer; 1995.
- Monroe, S.S., Jiang, B., Stine, S.E., Koopmans, M., Glass, R.I., 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of *Astroviridae* as a new family of RNA viruses. *J. Virol.* 67, 3611–3614.

- Morand, S., Jittapalapong, S., Suputtamongkol, Y., Abdullah, M.T., Huan, T.B., 2014. Infectious Diseases and Their Outbreaks in Asia-Pacific: Biodiversity and Its Regulation Loss Matter. PLoS ONE 9. doi:10.1371/journal.pone.0090032
- Moratelli, R., Calisher, C.H., 2015. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 1–22. doi:10.1590/0074-02760150048
- Morens, D.M., Folkers, G.K., Fauci, A.S., 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. Nature 430, 242–249. doi:10.1038/nature02759
- Morse, S.S., 2004. Factors and determinants of disease emergence. Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot. 23, 443–451.
- Morse, S.S., 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg. Infect. Dis. 1, 7–15. doi:10.3201/eid0101.950102
- Moser, L.A., Carter, M., Schultz-Cherry, S., 2007. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. J. Virol. 81, 11937–11945. doi:10.1128/JVI.00942-07
- Moya, A., Holmes, E.C., González-Candelas, F., 2004. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. Nat. Rev. Microbiol. 2, 279–288. doi:10.1038/nrmicro863
- Müller, M.A., Paweska, J.T., Leman, P.A., Drosten, C., Grywna, K., Kemp, A., Braack, L., Sonnenberg, K., Niedrig, M., Swanepoel, R., 2007. Coronavirus antibodies in African bat species. Emerg. Infect. Dis. 13, 1367–1370. doi:10.3201/eid1309.070342
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D., 1995. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag.
- Murray, K., Selleck, P., Hooper, P., Hyatt, A., Gould, A., Gleeson, L., Westbury, H., Hiley, L., Selvey, L., Rodwell, B., 1995. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. Science 268, 94–97.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403, 853–858. doi:10.1038/35002501
- Myint, S.H., 1995. Human Coronavirus Infections, in: Siddell, S.G. (Ed.), The Coronaviridae, The Viruses. Springer US, pp. 389–401.
- Naylor, R.L., Ehlich, P.R., 2012. Natural pest control services and agriculture., in: Nature's Services: Societal Dependence On Natural Ecosystems. Island Press, pp. 151–171.
- NCBI, 2016. bat astrovirus capsid - Nucleotide - NCBI [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> (accessed 8.23.16).
- Nelson, C.W., Hughes, A.L., 2015. Within-host nucleotide diversity of virus populations: Insights from next-generation sequencing. Infect. Genet. Evol. 30, 1–7. doi:10.1016/j.meegid.2014.11.026
- Norberg, U.M., 1994. Wing design, flight performance, and habitat use in bats. Ecol. Morphol. Integr. Org. Biol. 205–239.
- Norberg, U.M., 1985. Evolution of Vertebrate Flight: An Aerodynamic Model for the Transition from Gliding to Active Flight. Am. Nat. 126, 303–327.
- Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., Risco, C., 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ. 97, 147–172. doi:10.1042/BC20040058
- Nzuki, Kinkwono, Sekle, 2011. Utilisation du guano comme substitut du Di- Ammonium Phosphate (DAP) dans la fertilisation du soja et de la tomate en République Démocratique du Congo [WWW Document]. URL <http://www.tropicultura.org/text/v29n2/114.pdf> (accessed 12.20.15).
- Ohta, A., Nishiyama, Y., 2011. Mitochondria and viruses. Mitochondrion 11, 1–12. doi:10.1016/j.mito.2010.08.006
- Olival, K.J., Hayman, D.T.S., 2014. Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. Viruses 6, 1759–1788. doi:10.3390/v6041759

- Ollivier, F.J., Samuelson, D.A., Brooks, D.E., Lewis, P.A., Kallberg, M.E., Komáromy, A.M., 2004. Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). *Vet. Ophthalmol.* 7, 11–22. doi:10.1111/j.1463-5224.2004.00318.x
- Olson, J.G., Rupprecht, C., Rollin, P.E., An, U.S., Niezgoda, M., Clemins, T., Walston, J., Ksiazek, T.G., 2002. Antibodies to Nipah-like virus in bats (*Pteropus lylei*), Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 987–988. doi:10.3201/eid0809.010515
- Omatsu, T., Nishimura, Y., Bak, E.J., Ishii, Y., Tohya, Y., Kyuwa, S., Akashi, H., Yoshikawa, Y., 2006. Molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the bat CD4. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 309–313. doi:10.1016/j.vetimm.2005.12.002
- Osborne, J.C., Rupprecht, C.E., Olson, J.G., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Niezgoda, M., Goldsmith, C.S., An, U.S., Nichol, S.T., 2003. Isolation of Kaeng Khoi virus from dead *Chaerephon plicata* bats in Cambodia. *J. Gen. Virol.* 84, 2685–2689. doi:10.1099/vir.0.19294-0
- O’Shea, T.J., Cryan, P.M., Cunningham, A.A., Fooks, A.R., Hayman, D.T.S., Luis, A.D., Peel, A.J., Plowright, R.K., Wood, J.L.N., 2014. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 741–745. doi:10.3201/eid2005.130539
- Oum, S., Keat, P., Saphonn, V., Oum, P., 2005. Human Resources for Health and Child Survival in Cambodia. *Asia Pac. Action Alliance Hum. Resour. Health Ctry. Rev.*
- Paparini, A., Gofton, A., Yang, R., White, N., Bunce, M., Ryan, U.M., 2015. Comparison of Sanger and next generation sequencing performance for genotyping *Cryptosporidium* isolates at the 18S rRNA and actin loci. *Exp. Parasitol.* 151–152, 21–27. doi:10.1016/j.exppara.2015.02.001
- Papenfuss, A.T., Baker, M.L., Feng, Z.-P., Tachedjian, M., Crameri, G., Cowled, C., Ng, J., Janardhana, V., Field, H.E., Wang, L.-F., 2012. The immune gene repertoire of an important viral reservoir, the Australian black flying fox. *Bmc Genomics* 13, 261. doi:10.1186/1471-2164-13-261
- Paphassarang, C., Philavong, K., Boupha, B., Blas, E., 2002. Equity, privatization and cost recovery in urban health care: the case of Lao PDR. *Health Policy Plan.* 17, 72–84. doi:10.1093/heapol/17.suppl_1.72
- Passos, J.F., von Zglinicki, T., 2005. Mitochondria, telomeres and cell senescence. *Exp. Gerontol.* 40, 466–472. doi:10.1016/j.exger.2005.04.006
- Paton, N.I., Leo, Y.S., Zaki, S.R., Auchus, A.P., Lee, K.E., Ling, A.E., Chew, S.K., Ang, B., Rollin, P.E., Umapathi, T., Sng, I., Lee, C.C., Lim, E., Ksiazek, T.G., 1999. Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *The Lancet* 354, 1253–1256. doi:10.1016/S0140-6736(99)04379-2
- Patz, J.A., Epstein, P.R., Burke, T.A., Balbus, J.M., 1996. Global climate change and emerging infectious diseases. *J. Am. Med. Assoc.* 275, 217–223. doi:10.1001/jama.1996.03530270057032
- Paul, B.N., Chakravarty, A.K., 1986. In vitro analysis of delayed immune response in a bat, *Pteropus giganteus*: Process of con-A mediated activation. *Dev. Comp. Immunol.* 10, 55–67. doi:10.1016/0145-305X(86)90044-3
- Pedersen, S.C., Müller, R., 2013. Nasal-Emission and Nose leaves, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), *Bat Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer New York, pp. 71–91.
- Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K.S., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C.C., Chan, K.H., Tsang, D.N.C., Yung, R.W.H., Ng, T.K., Yuen, K.Y., SARS study group, 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 361, 1319–1325.
- Perlman, S., Netland, J., 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 439–450. doi:10.1038/nrmicro2147
- Pfefferle, S., Oppong, S., Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Müller, M.A., Annan, A., Vallo, P., Adu-Sarkodie, Y., Kruppa, T.F., Drosten, C., 2009a. Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1377–1385.
- Pfefferle, S., Oppong, S., Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Müller, M.A., Annan, A., Vallo, P., Adu-Sarkodie, Y., Kruppa, T.F., Drosten, C., 2009b. Distant relatives of severe

- acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1377–1384. doi:10.3201/eid1509.090224
- Plowright, R.K., Eby, P., Hudson, P.J., Smith, I.L., Westcott, D., Bryden, W.L., Middleton, D., Reid, P.A., McFarlane, R.A., Martin, G., Tabor, G.M., Skerratt, L.F., Anderson, D.L., Crameri, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L.-F., Epstein, J.H., Marsh, G.A., Kung, N.Y., McCallum, H., 2015. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc. Biol. Sci.* 282, 20142124. doi:10.1098/rspb.2014.2124
- Plowright, R.K., Field, H.E., Smith, C., Divljan, A., Palmer, C., Tabor, G., Daszak, P., Foley, J.E., 2008. Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc. Biol. Sci.* 275, 861–869. doi:10.1098/rspb.2007.1260
- Presley, S.J., Willig, M.R., Wunderle, J., Saldanha, L.N., 2008. Effects of reduced-impact logging and forest physiognomy on bat populations of lowland Amazonian forest. *J. Appl. Ecol.* 45, 14–25. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01373.x
- Qian, Z., Dominguez, S.R., Holmes, K.V., 2013. Role of the Spike Glycoprotein of Human Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Virus Entry and Syncytia Formation. *PLOS ONE* 8, e76469. doi:10.1371/journal.pone.0076469
- Qin, Z., Jinming, C., Xiaojun, H., Huanying, Z., Jicheng, H., Ling, F., Kunpeng, L., Jingqiang, Z., 2004. The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* 73, 332–337. doi:10.1002/jmv.20095
- Quan, P.-L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J.A., Petrosov, A., Tashmukhamedova, A., Hutchison, S.K., Egholm, M., Osinubi, M.O.V., Niezgoda, M., Ogunkoya, A.B., Briesse, T., Rupprecht, C.E., Lipkin, W.I., 2010. Identification of a Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Like Virus in a Leaf-Nosed Bat in Nigeria. *mBio* 1, e00208-10. doi:10.1128/mBio.00208-10
- Racey, P.A., 2013. Bat Conservation: Past, Present and Future, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), *Bat Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer New York, pp. 517–532.
- Raghuram, H., Thangadurai, C., Gopukumar, N., Nathar, K., Sripathi, K., 2009. The role of olfaction and vision in the foraging behaviour of an echolocating megachiropteran fruit bat, *Rousettus leschenaulti* (*Pteropodidae*). *Mamm. Biol. - Z. Für Säugetierkd.* 74, 9–14. doi:10.1016/j.mambio.2008.02.008
- Raj, V.S., Mou, H., Smits, S.L., Dekkers, D.H.W., Müller, M.A., Dijkman, R., Muth, D., Demmers, J.A.A., Zaki, A., Fouchier, R.A.M., Thiel, V., Drosten, C., Rottier, P.J.M., Osterhaus, A.D.M.E., Bosch, B.J., Haagmans, B.L., 2013. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495, 251–254. doi:10.1038/nature12005
- Redfern, S.K., Azzu, N., Binamira, J.S., 2012. Rice in Southeast Asia: facing risks and vulnerabilities to respond to climate change. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), pp. 295–314.
- Reeder, W.G., Cowles, R.B., 1951. Aspects of Thermoregulation in Bats. *J. Mammal.* 32, 389–403. doi:10.2307/1375787
- Reghunathan, R., Jayapal, M., Hsu, L.-Y., Chng, H.-H., Tai, D., Leung, B.P., Melendez, A.J., 2005. Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *BMC Immunol.* 6, 2. doi:10.1186/1471-2172-6-2
- Ren, W., Li, W., Yu, M., Hao, P., Zhang, Y., Zhou, P., Zhang, S., Zhao, G., Zhong, Y., Wang, S., Wang, L.-F., Shi, Z., 2006. Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis. *J. Gen. Virol.* 87, 3355–3359. doi:10.1099/vir.0.82220-0
- Ren, W., Qu, X., Li, W., Han, Z., Yu, M., Zhou, P., Zhang, S.-Y., Wang, L.-F., Deng, H., Shi, Z., 2008. Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J. Virol.* 82, 1899–1907. doi:10.1128/JVI.01085-07
- Reuter, G., Pankovics, P., Boros, A., 2011. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. *Arch. Virol.* 156, 125–128. doi:10.1007/s00705-010-0827-5
- Reuter, G., Pankovics, P., Delwart, E., Boros, Á., 2012. Identification of a novel astrovirus in domestic sheep in Hungary. *Arch. Virol.* 157, 323–327. doi:10.1007/s00705-011-1151-4

- Reynes, J.-M., Counor, D., Ong, S., Faure, C., Seng, V., Molia, S., Walston, J., Georges-Courbot, M.C., Deubel, V., Sarthou, J.-L., 2005. Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1042–1047. doi:10.3201/eid1107.041350
- Reynes, J.-M., Molia, S., Audry, L., Hout, S., Ngin, S., Walston, J., Bourhy, H., 2004. Serologic Evidence of Lyssavirus Infection in Bats, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2231–2234. doi:10.3201/eid1012.040459
- Rihtaric, D., Hostnik, P., Steyer, A., Grom, J., Toplak, I., 2010. Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia. *Arch. Virol.* 155, 507–514. doi:10.1007/s00705-010-0612-5
- Ripperger, S.P., Tschapka, M., Kalko, E.K., V, Rodriguez-herrera, B., Mayer, F., 2013. Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. *Conserv. Genet.* 14, 925–934. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10592-012-0434-y
- Rock, M., Buntain, B.J., Hatfield, J.M., Hallgrímsson, B., 2009. Animal-human connections, “one health,” and the syndemic approach to prevention. *Soc. Sci. Med.* 68, 991–995.
- Rodriguez, J.J., Horvath, C.M., 2004. Host Evasion by Emerging Paramyxoviruses: Hendra Virus and Nipah Virus V Proteins Inhibit Interferon Signaling. *Viral Immunol.* 17, 210–219. doi:10.1089/0882824041310568
- Rosling, L., Rosling, M., 2003. Pneumonia causes panic in Guangdong province. *BMJ* 326, 416. doi:10.1136/bmj.326.7386.416
- Sabir, J.S.M., Lam, T.T.-Y., Ahmed, M.M.M., Li, L., Shen, Y., Abo-Aba, S.E.M., Qureshi, M.I., Abu-Zeid, M., Zhang, Y., Khiyami, M.A., Alharbi, N.S., Hajrah, N.H., Sabir, M.J., Mutwakil, M.H.Z., Kabli, S.A., Alsulaimany, F.A.S., Obaid, A.Y., Zhou, B., Smith, D.K., Holmes, E.C., Zhu, H., Guan, Y., 2016. Co-circulation of three camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science* 351, 81–84. doi:10.1126/science.aac8608
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Iii, Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H., 2000. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* 287, 1770–1774. doi:10.1126/science.287.5459.1770
- Salaün, J.J., Klein, J.M., Hebrad, G., 1974. A new virus, Phnom-Penh bat virus, isolated in Cambodia from a short-nosed fruit bat, *Cynopterus brachyotis* angulatus. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 125A, 485–95.
- Sampaio, E., Lim, B., Peters, S., 2008. *Diphylla ecaudata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T6628A12791373.
- Samuel, H., 2013. Frozen porcupines and bats confiscated in Paris exotic food raid.
- Sanchez-Fauquier, A., Carrascosa, A.L., Carrascosa, J.L., Otero, A., Glass, R.I., Lopez, J.A., San Martin, C., Melero, J.A., 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* 201, 312–320. doi:10.1006/viro.1994.1296
- Sarkar, S.K., Chakravarty, A.K., 1991. Analysis of immunocompetent cells in the bat, *Pteropus giganteus*: Isolation and scanning electron microscopic characterization. *Dev. Comp. Immunol.* 15, 423–430. doi:10.1016/0145-305X(91)90034-V
- Savey, M., Laude, H., 1979. Les diarrhees neo-natales d'origine virale chez le porc (1. partie). *Point Veterinaire*.
- Saywell, T., Fowler, G., Crispin, S., 2003. The cost of SARS: \$11 billion and rising. *Dow Jones Far East. Econ. Rev.*
- Schad, J., Dechmann, D.K.N., Voigt, C.C., Sommer, S., 2011. MHC class II DRB diversity, selection pattern and population structure in a neotropical bat species, *Noctilio albiventris*. *Heredity* 107, 115–126. doi:10.1038/hdy.2010.173
- Schountz, T., 2014. Immunology of Bats and Their Viruses: Challenges and Opportunities. *Viruses* 6, 4880–4901. doi:10.3390/v6124880

- Schultz-Cherry, S., 2012. *Astrovirus Research: Essential Ideas, Everyday Impacts, Future Directions*. Springer Science & Business Media.
- Schultze, B., Herrler, G., 1992. Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *J. Gen. Virol.* 73, 901–906. doi:10.1099/0022-1317-73-4-901
- Selvey, L.A., Wells, R.M., McCormack, J.G., Ansford, A.J., Murray, K., Rogers, R.J., Lavercombe, P.S., Selleck, P., Sheridan, J.W., 1995. Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus. *Med. J. Aust.* 162, 642–645.
- Sendow, I., Ratnawati, A., Taylor, T., Adjid, R.M.A., Saepullo, M., Barr, J., Wong, F., Daniels, P., Field, H., 2013. Nipah virus in the fruit bat *Pteropus vampyrus* in Sumatera, Indonesia. *PloS One* 8, e69544. doi:10.1371/journal.pone.0069544
- Sétien, A.A., Brochier, B., Tordo, N., De Paz, O., Desmettre, P., Péharpré, D., Pastoret, P.P., 1998. Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine* 16, 1122–1126.
- Seymour, C., Dickerman, R.W., Martin, M.S., 1978. Venezuelan encephalitis virus infection in neotropical bats. II. Experimental infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 297–306.
- Shan, T., Li, L., Simmonds, P., Wang, C., Moeser, A., Delwart, E., 2011. The fecal virome of pigs on a high-density farm. *J. Virol.* 85, 11697–11708. doi:10.1128/JVI.05217-11
- Shan, T., Wang, C., Tong, W., Zheng, H., Hua, X., Yang, S., Guo, Y., Zhang, W., Tong, G., 2012. Complete Genome of a Novel Porcine Astrovirus. *J. Virol.* 86, 13820–13821. doi:10.1128/JVI.02598-12
- Shaulian, E., Karin, M., 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–136. doi:10.1038/ncb0502-e131
- Sheahan, T., Rockx, B., Donaldson, E., Sims, A., Pickles, R., Corti, D., Baric, R., 2008. Mechanisms of Zoonotic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Host Range Expansion in Human Airway Epithelium. *J. Virol.* 82, 2274–2285. doi:10.1128/JVI.02041-07
- Shi, L., Rui, W., Lee, M., 2003. Nuclear targeting sequence in SARS nucleocapsid protein, in: CMBI.
- Shirato, K., Kawase, M., Matsuyama, S., 2013. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J. Virol.* 87, 12552–12561. doi:10.1128/JVI.01890-13
- Shirogane, Y., Takeda, M., Iwasaki, M., Ishiguro, N., Takeuchi, H., Nakatsu, Y., Tahara, M., Kikuta, H., Yanagi, Y., 2008. Efficient Multiplication of Human Metapneumovirus in Vero Cells Expressing the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J. Virol.* 82, 8942–8946. doi:10.1128/JVI.00676-08
- Shoham, D., 2006. Review: molecular evolution and the feasibility of an avian influenza virus becoming a pandemic strain—a conceptual shift. *Virus Genes* 33, 127–132. doi:10.1007/s11262-005-0047-3
- Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., Gallagher, T., 2011. A Transmembrane Serine Protease Is Linked to the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor and Activates Virus Entry. *J. Virol.* 85, 873–882. doi:10.1128/JVI.02062-10
- Sim, S., Hibberd, M.L., 2016. Genomic approaches for understanding dengue: insights from the virus, vector, and host. *Genome Biol.* 17, 38. doi:10.1186/s13059-016-0907-2
- Simmons, N.B., 2005. Evolution. An Eocene big bang for bats. *Science* 307, 527–528. doi:10.1126/science.1108871
- Simmons, N.B., Seymour, K.L., Habersetzer, J., Gunnell, G.F., 2008. Primitive Early Eocene bat from Wyoming and the evolution of flight and echolocation. *Nature* 451, 818–821. doi:10.1038/nature06549
- Sin, S., Moeung, P., Hun, R., Ros, S., Ros, H., Leach, K., Brosbst, C., 2005. Cambodia health workers incentive survey. *News. MEDICAM* 4, 14.
- Sisouphanthong, B., Taillard, C., 2000. *Atlas of Laos: The spatial structures of economic and social development of the Lao People's Democratic Republic*. St. Martin's Press.

- Smith, A.C., Fahrig, L., Francis, C.M., 2011. Landscape size affects the relative importance of habitat amount, habitat fragmentation, and matrix quality on forest birds. *Ecography* 34, 103–113. doi:10.1111/j.1600-0587.2010.06201.x
- Smith, E.C., Blanc, H., Vignuzzi, M., Denison, M.R., 2013. Coronaviruses Lacking Exoribonuclease Activity Are Susceptible to Lethal Mutagenesis: Evidence for Proofreading and Potential Therapeutics. *PLOS Pathog* 9, e1003565. doi:10.1371/journal.ppat.1003565
- Smith, E.C., Case, J.B., Blanc, H., Isakov, O., Shomron, N., Vignuzzi, M., Denison, M.R., 2015. Mutations in coronavirus nonstructural protein 10 decrease virus replication fidelity. *J. Virol.* 89, 6418–6426. doi:10.1128/JVI.00110-15
- Smith, E.C., Denison, M.R., 2013. Coronaviruses as DNA Wannabes: A New Model for the Regulation of RNA Virus Replication Fidelity. *PLOS Pathog* 9, e1003760. doi:10.1371/journal.ppat.1003760
- Sodhi, N.S., Koh, L.P., Brook, B.W., Ng, P.K.L., 2004. Southeast Asian biodiversity: an impending disaster. *Trends Ecol. Evol.* 19, 654–660. doi:10.1016/j.tree.2004.09.006
- Sohal, R.S., Orr, W.C., 1995. *Molecular Aspects of Aging*. Esser K Martin GM N. Y. Wiley 109–127.
- Song, D., Moon, H., Kang, B., 2015. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 4, 166–176. doi:10.7774/cevr.2015.4.2.166
- Song, D., Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167–175. doi:10.1007/s11262-012-0713-1
- Springer, M.S., 2013. Phylogenetics: bats united, microbats divided. *Curr. Biol.* CB 23, R999–1001. doi:10.1016/j.cub.2013.09.053
- Springer, M.S., Teeling, E.C., Madsen, O., Stanhope, M.J., de Jong, W.W., 2001. Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6241–6246. doi:10.1073/pnas.111551998
- Stibig, H.-J., Achard, F., Carboni, S., Rasi, R., Miettinen, J., 2014. Change in tropical forest cover of Southeast Asia from 1990 to 2010 - ProQuest. *Biogeosciences* 11, 247–258. doi:doi:10.5194/bg-11-247-2014
- Stibig, H.J., Stolle, F., Dennis, R., Feldkötter, C., 2007. Forest Cover Change in Southeast Asia-The Regional Pattern. *JRC Sci. Tech. Rep.* EUR 22896.
- Stockman, L.J., Bellamy, R., Garner, P., 2006. SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS Med.* 3, e343. doi:10.1371/journal.pmed.0030343
- Stoker, B., 1897. *Dracula* 1897. Bram Stoker.
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., Gao, G.F., 2016. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24, 490–502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003
- Sulkin, S.E., Allen, R., 1974. Virus infections in bats. viii+103pp.
- Sulkin, S.E., Allen, R., Sims, R., 1966a. Studies of arthropod-borne virus infections in chiroptera. III. Influence of environmental temperature on experimental infection with Japanese B and St. Louis encephalitis viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 406–17.
- Sulkin, S.E., Allen, R., Sims, R., Singh, K.V., 1966b. Studies of arthropod-borne virus infections in chiroptera. IV. The immune response of the big brown bat (*Eptesicus f. fuscus*) maintained at various environmental temperatures to experimental Japanese B encephalitis virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 418–27.
- Swanepoel, R., 2007. Studies of Reservoir Hosts for Marburg virus. *Emerg. Infect. Dis.* Print Ed. 13, 1847–1851.
- Swift, L., Hunter, P.R., Lees, A.C., Bell, D.J., 2007. Wildlife Trade and the Emergence of Infectious Diseases. *EcoHealth* 4, 25–30. doi:10.1007/s10393-006-0076-y
- Tang, X.C., Zhang, J.X., Zhang, S.Y., Wang, P., Fan, X.H., Li, L.F., Li, G., Dong, B.Q., Liu, W., Cheung, C.L., Xu, K.M., Song, W.J., Vijaykrishna, D., Poon, L.L.M., Peiris, J.S.M., Smith, G.J.D., Chen, H., Guan, Y., 2006. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J. Virol.* 80, 7481–7490. doi:10.1128/JVI.00697-06

- Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, M.E.J., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356, 983–989. doi:10.1098/rstb.2001.0888
- Taylor, M.B., Walter, J., Berke, T., Cubitt, W.D., Mitchell, D.K., Matson, D.O., 2001. Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. *J. Med. Virol.* 64, 256–261.
- Teeling, E.C., 2009. Hear, hear: the convergent evolution of echolocation in bats? *Trends Ecol. Evol.* 24, 351–354. doi:10.1016/j.tree.2009.02.012
- Teeling, E.C., Scally, M., Kao, D.J., Romagnoli, M.L., Springer, M.S., Stanhope, M.J., 2000. Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature* 403, 188–192. doi:10.1038/35003188
- Teeling, E.C., Springer, M.S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien, S.J., Murphy, W.J., 2005. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307, 580–584. doi:10.1126/science.1105113
- Telle, O., Vaguet, A., Yadav, N.K., Lefebvre, B., Daudé, E., Paul, R.E., Cebeillac, A., Nagpal, B.N., 2016. The Spread of Dengue in an Endemic Urban Milieu--The Case of Delhi, India. *PloS One* 11, e0146539. doi:10.1371/journal.pone.0146539
- Thi, S., Furey, N.M., Jurgens, J.A., 2014. Effect of bat guano on the growth of five economically important plant species. *J. Trop. Agric.* 52, 169–173.
- Thiel, V., 2007. *Coronaviruses: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press.
- Thomas, D.W., 1983. The annual migrations of three species of West African fruit bats (Chiroptera: Pteropodidae). *Can. J. Zool.* 61, 2266–2272. doi:10.1139/z83-299
- Thomas, N.M., Duckworth, J.W., Douangboubpha, B., Williams, M., Francis, C.M., 2013. A checklist of bats (*Mammalia: Chiroptera*) from Lao PDR. *Acta Chiropterologica* 15, 193–260.
- Thomas, S.P., Suthers, R.A., 1972. The Physiology and Energetics of Bat Flight. *J. Exp. Biol.* 57, 317–335.
- Tong, S., Conrardy, C., Ruone, S., Kuzmin, I.V., Guo, X., Tao, Y., Niezgoda, M., Haynes, L., Agwanda, B., Breiman, R.F., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E., 2009. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 482–485. doi:10.3201/eid1503.081013
- Toussaint, C., 1995. Les hélicases. *MS Médecine Sci.* 11, 1389–1398.
- Tsang, K.W., Ho, P.L., Ooi, G.C., Yee, W.K., Wang, T., Chan-Yeung, M., Lam, W.K., Seto, W.H., Yam, L.Y., Cheung, T.M., Wong, P.C., Lam, B., Ip, M.S., Chan, J., Yuen, K.Y., Lai, K.N., 2003. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* 348, 1977–1985. doi:10.1056/NEJMoa030666
- Tsang, S.M., Cirranello, A.L., Bates, P.J.J., Simmons, N.B., 2016. The Roles of Taxonomy and Systematics in Bat Conservation, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 503–538.
- Tuladhar-Douglas, W., 2008. The Use Of Bats As Medicine Among The Newars. *J. Ethnobiol.* 28, 69–91. doi:10.2993/0278-0771(2008)28[69:TUOBAM]2.0.CO;2
- Turmelle, A.S., Olival, K.J., 2009. Correlates of Viral Richness in Bats (Order Chiroptera). *Ecohealth* 6, 522–539.
- Tyrrell, D.A., Bynoe, M.L., 1965. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br. Med. J.* 1, 1467–1470.
- Tyrrell, D.A.J., Myint, S.H., 1996. Coronaviruses, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- UNAIDS, 2016. . Fact Sheet 2016 UNAIDS. URL <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (accessed 8.5.16).
- Vabret, A., Brouard, J., Petitjean, J., Eugene-Ruellan, G., Freymuth, F., 1998. Infections à coronavirus humains: Importance et diagnostic. *Presse Médicale* 27, 1813–1817.
- Vabret, A., Mourez, T., Dina, J., Freymuth, F., 2005. Coronavirus humains. *Virologie* 9, 273–287.

- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J.M., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B., 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* 10, 368–373. doi:10.1038/nm1024
- van Hemert, F.J., Berkhout, B., Lukashov, V.V., 2007a. Host-related nucleotide composition and codon usage as driving forces in the recent evolution of the Astroviridae. *Virology* 361, 447–454. doi:10.1016/j.virol.2006.11.021
- van Hemert, F.J., Lukashov, V.V., Berkhout, B., 2007b. Different rates of (non-)synonymous mutations in astrovirus genes; correlation with gene function. *Virol. J.* 4, 25. doi:10.1186/1743-422X-4-25
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2003. *Modern Applied Statistics with S*. JSTOR.
- Veselka, N., McErlain, D.D., Holdsworth, D.W., Eger, J.L., Chhem, R.K., Mason, M.J., Brain, K.L., Faure, P.A., Fenton, M.B., 2010. A bony connection signals laryngeal echolocation in bats. *Nature* 463, 939–942. doi:10.1038/nature08737
- Vijay, R., Perlman, S., 2016. Middle East respiratory syndrome and severe acute respiratory syndrome. *Curr. Opin. Virol.* 16, 70–76. doi:10.1016/j.coviro.2016.01.011
- Vijaykrishna, D., Smith, G.J.D., Zhang, J.X., Peiris, J.S.M., Chen, H., Guan, Y., 2007. Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J. Virol.* 81, 4012–4020. doi:10.1128/JVI.02605-06
- Vijgen, L., Keyaerts, E., Moës, E., Thoelen, I., Wollants, E., Lemey, P., Vandamme, A.-M., Van Ranst, M., 2005. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.* 79, 1595–1604. doi:10.1128/JVI.79.3.1595-1604.2005
- Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W., Palese, P., 1988. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4526–4529.
- Voigt, C., Kingston, T., 2016. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing.
- Wacharapluesadee, S., Boongird, K., Wanghongsa, S., Ratanasetyuth, N., Supavonwong, P., Saengsen, D., Gongal, G.N., Hemachudha, T., 2010. A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in *Pteropus lylei* bats in Thailand: evidence for seasonal preference in disease transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 10, 183–190. doi:10.1089/vbz.2008.0105
- Wacharapluesadee, S., Duengkae, P., Rodpan, A., Kaewpom, T., Maneeorn, P., Kanchanasaka, B., Yingsakmongkon, S., Sittidetboripat, N., Chareesaen, C., Khlangsap, N., Pidthong, A., Leadprathom, K., Ghai, S., Epstein, J.H., Daszak, P., Olival, K.J., Blair, P.J., Callahan, M.V., Hemachudha, T., 2015b. Diversity of coronavirus in bats from Eastern Thailand. *Virol. J.* 12, 57. doi:10.1186/s12985-015-0289-1
- Wacharapluesadee, S., Sintunawa, C., Kaewpom, T., Khongnomnan, K., Olival, K.J., Epstein, J.H., Rodpan, A., Sangsri, P., Intarut, N., Chindamporn, A., Suksawa, K., Hemachudha, T., 2013. Group C betacoronavirus in bat guano fertilizer, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1349–1351. doi:10.3201/eid1908.130119
- Wain, L.V., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Decker, J.M., Keele, B.F., Heuverswyn, F.V., Li, Y., Takehisa, J., Ngole, E.M., Shaw, G.M., Peeters, M., Hahn, B.H., Sharp, P.M., 2007. Adaptation of HIV-1 to Its Human Host. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1853–1860. doi:10.1093/molbev/msm110
- Walker, S., 2005. Some informal correspondance on local people's medicinal uses of fruit bats. *Bat Net Newsl Newsl Chiropt Conserv Inf Netw South Asia* 6.
- Walter, J.E., Briggs, J., Guerrero, M.L., Matson, D.O., Pickering, L.K., Ruiz-Palacios, G., Berke, T., Mitchell, D.K., 2001. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch. Virol.* 146, 2357–2367.
- Wang, L.-F., Cowled, C., 2015. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. John Wiley & Sons.
- Wang, L.-F., Crameri, G., 2014. Emerging zoonotic viral diseases. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 33, 569–581.

- Wang, L.F., Eaton, B.T., 2007. Bats, civets and the emergence of SARS. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 315, 325–344.
- Wang, L.-F., Walker, P.J., Poon, L.L.M., 2011. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats “special” as reservoirs for emerging viruses? *Curr. Opin. Virol.* 1, 649–657. doi:10.1016/j.coviro.2011.10.013
- Wang, N., Shi, X., Jiang, L., Zhang, S., Wang, D., Tong, P., Guo, D., Fu, L., Cui, Y., Liu, X., Arledge, K.C., Chen, Y.-H., Zhang, L., Wang, X., 2013. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res.* 23, 986–993. doi:10.1038/cr.2013.92
- Wang, Q., Qi, J., Yuan, Y., Xuan, Y., Han, P., Wan, Y., Ji, W., Li, Y., Wu, Y., Wang, J., Iwamoto, A., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., Yan, J., Lu, G., Gao, G.F., 2014. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host Microbe* 16, 328–337. doi:10.1016/j.chom.2014.08.009
- Watanabe, S., Masangkay, J.S., Nagata, N., Morikawa, S., Mizutani, T., Fukushi, S., Alviola, P., Omatsu, T., Ueda, N., Iha, K., Taniguchi, S., Fujii, H., Tsuda, S., Endoh, M., Kato, K., Tohya, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., Akashi, H., 2010. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1217–1223. doi:10.3201/eid1608.100208
- Wathelet, M.G., Orr, M., Frieman, M.B., Baric, R.S., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J. Virol.* 81, 11620–11633. doi:10.1128/JVI.00702-07
- Weber, N., Duengkae, P., Fahr, J., Dechmann, D.K.N., Phengsakul, P., Khumbucha, W., Siriaronrat, B., Wacharapluesadee, S., Maneerorn, P., Wikelski, M., Newman, S., 2015. High-resolution GPS tracking of Lyle’s flying fox between temples and orchards in central Thailand. *J. Wildl. Manag.* 79, 957–968. doi:10.1002/jwmg.904
- Weiss, S.R., Navas-Martin, S., 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 69, 635–664. doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005
- Whittaker, R.J., Bush, M.B., Partomihardjo, T., Asquith, N.M., Richards, K., 1992. Ecological aspects of plant colonisation of the Krakatau Islands. *GeoJournal* 28, 201–211. doi:10.1007/BF00177233
- WHO, 2016. . WHO Ebola Virus Dis. Outbreak. URL <http://www.who.int/csr/disease/ebola/en/> (accessed 8.5.16).
- WHO, 2015. Global outbreak alert and response network (GOARN).
- Wild, T.F., 2009. Henipaviruses: a new family of emerging Paramyxoviruses. *Pathol. Biol. (Paris)* 57, 188–196. doi:10.1016/j.patbio.2008.04.006
- Wildlife, S.C., 2014. Atlas of Cambodia. Maps on socio-economic development and environment. Save Cambodia’s Wildlife, Phnom Penh.
- Wilhelm Filho, D., Althoff, S.L., Dafré, A.L., Boveris, A., 2007. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 146, 214–220. doi:10.1016/j.cbpc.2006.11.015
- Willcocks, M.M., Ashton, N., Kurtz, J.B., Cubitt, W.D., Carter, M.J., 1994. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J. Virol.* 68, 6057–6058.
- Williams-Guillén, K., Olimpi, E., Maas, B., Taylor, P.J., Arlettaz, R., 2016. Bats in the Anthropogenic Matrix: Challenges and Opportunities for the Conservation of Chiroptera and Their Ecosystem Services in Agricultural Landscapes, in: Voigt, C.C., Kingston, T. (Eds.), *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer International Publishing, pp. 151–186.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M., 2005. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. JHU Press.
- Wilson, M.E., 1995. Travel and the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 1, 39–46.
- Wolfaardt, M., Kiulia, N.M., Mwenda, J.M., Taylor, M.B., 2011. Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 728–731. doi:10.1128/JCM.01093-10

- Wolfe, N.D., Dunavan, C.P., Diamond, J., 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447, 279–283. doi:10.1038/nature05775
- Wong, S., Lau, S., Woo, P., Yuen, K.-Y., 2007. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev. Med. Virol.* 17, 67–91. doi:10.1002/rmv.520
- Wong, S.K., Li, W., Moore, M.J., Choe, H., Farzan, M., 2004. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 279, 3197–3201. doi:10.1074/jbc.C300520200
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Chu, C., Chan, K., Tsoi, H., Huang, Y., Wong, B.H.L., Poon, R.W.S., Cai, J.J., Luk, W., Poon, L.L.M., Wong, S.S.Y., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Yuen, K., 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* 79, 884–895. doi:10.1128/JVI.79.2.884-895.2005
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Huang, Y., Yuen, K.-Y., 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 234, 1117–1127. doi:10.3181/0903-MR-94
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Li, K.S.M., Poon, R.W.S., Wong, B.H.L., Tsoi, H., Yip, B.C.K., Huang, Y., Chan, K., Yuen, K., 2006a. Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology* 351, 180–187. doi:10.1016/j.virol.2006.02.041
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Yip, C.C.Y., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2006b. Comparative Analysis of 22 Coronavirus HKU1 Genomes Reveals a Novel Genotype and Evidence of Natural Recombination in Coronavirus HKU1. *J. Virol.* 80, 7136–7145. doi:10.1128/JVI.00509-06
- Woo, P.C.Y., Wang, M., Lau, S.K.P., Xu, H., Poon, R.W.S., Guo, R., Wong, B.H.L., Gao, K., Tsoi, H.-W., Huang, Y., Li, K.S.M., Lam, C.S.F., Chan, K.-H., Zheng, B.-J., Yuen, K.-Y., 2007. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J. Virol.* 81, 1574–1585. doi:10.1128/JVI.02182-06
- Woolhouse, M.E.J., Howey, R., Gaunt, E., Reilly, L., Chase-Topping, M., Savill, N., 2008. Temporal trends in the discovery of human viruses. *Proc. Biol. Sci.* 275, 2111–2115. doi:10.1098/rspb.2008.0294
- World Health Organization, 2003. WHO issues a global alert about cases of atypical pneumonia. Press Release Issued WHO March 12, 2003.
- Wu, Z., Ren, X., Yang, L., Hu, Y., Yang, J., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Du, J., Liu, L., Xue, Y., Wang, J., Yang, F., Zhang, S., Jin, Q., 2012. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J. Virol.* 86, 10999–11012. doi:10.1128/JVI.01394-12
- WWF, 2013. Ecosystems in the Greater Mekong: past trends, current status, possible futures, World Wide Fund For Nature, Greater Mekong: Bangkok, Thailand.
- Xiao, J., Li, J., Hu, G., Chen, Z., Wu, Y., Chen, Y., Chen, Z., Liao, Y., Zhou, J., Ke, X., Ma, L., Liu, S., Zhou, J., Dai, Y., Chen, H., Yu, S., Chen, Q., 2011. Isolation and phylogenetic characterization of bat astroviruses in southern China. *Arch. Virol.* 156, 1415–1423. doi:10.1007/s00705-011-1011-2
- Xiao, X., Chakraborti, S., Dimitrov, A.S., Gramatikoff, K., Dimitrov, D.S., 2003. The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1159–1164. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.054
- Xu, R.-H., He, J.-F., Evans, M.R., Peng, G.-W., Field, H.E., Yu, D.-W., Lee, C.-K., Luo, H.-M., Lin, W.-S., Lin, P., Li, L.-H., Liang, W.-J., Lin, J.-Y., Schnur, A., 2004. Epidemiologic clues to SARS origin in China. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1030–1038.
- Yadav, P.D., Raut, C.G., Shete, A.M., Mishra, A.C., Towner, J.S., Nichol, S.T., Mourya, D.T., 2012. Detection of Nipah Virus RNA in Fruit Bat (*Pteropus giganteus*) from India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 576–578. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0416
- Yang, L., Wu, Z., Ren, X., Yang, F., He, G., Zhang, J., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Du, J., Zhang, S., Jin, Q., 2013. Novel SARS-like betacoronaviruses in bats, China, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 989–991. doi:10.3201/eid1906.121648

- Yang, L., Wu, Z., Ren, X., Yang, F., Zhang, J., He, G., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Zhang, S., Jin, Q., 2014. MERS-related betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats, China. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1260–1262. doi:10.3201/eid2007.140318
- Yang, X.-L., Hu, B., Wang, B., Wang, M.-N., Zhang, Q., Zhang, W., Wu, L.-J., Ge, X.-Y., Zhang, Y.-Z., Daszak, P., Wang, L.-F., Shi, Z.-L., 2016. Isolation and Characterization of a Novel Bat Coronavirus Closely Related to the Direct Progenitor of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* 90, 3253–3256. doi:10.1128/JVI.02582-15
- Yang, Y., Du, L., Liu, C., Wang, L., Ma, C., Tang, J., Baric, R.S., Jiang, S., Li, F., 2014. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 12516–12521. doi:10.1073/pnas.1405889111
- Yang, Y., Liu, C., Du, L., Jiang, S., Shi, Z., Baric, R.S., Li, F., 2015. Two Mutations Were Critical for Bat-to-Human Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* 89, 9119–9123. doi:10.1128/JVI.01279-15
- Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellicchio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T., Holmes, K.V., 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357, 420–422. doi:10.1038/357420a0
- Yoneyama, M., Fujita, T., 2009. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol. Rev.* 227, 54–65. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00727.x
- Yu, M., Tachedjian, M., Crameri, G., Shi, Z., Wang, L.-F., 2010. Identification of key amino acid residues required for horseshoe bat angiotensin-I converting enzyme 2 to function as a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Gen. Virol.* 91, 1708–1712. doi:10.1099/vir.0.020172-0
- Zhang, G., Cowled, C., Shi, Z., Huang, Z., Bishop-Lilly, K.A., Fang, X., Wynne, J.W., Xiong, Z., Baker, M.L., Zhao, W., Tachedjian, M., Zhu, Y., Zhou, P., Jiang, X., Ng, J., Yang, L., Wu, L., Xiao, J., Feng, Y., Chen, Y., Sun, X., Zhang, Y., Marsh, G.A., Crameri, G., Broder, C.C., Frey, K.G., Wang, L.-F., Wang, J., 2013. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science* 339, 456–460. doi:10.1126/science.1230835
- Zhang, X.W., Yap, Y.L., Danchin, A., 2004. Testing the hypothesis of a recombinant origin of the SARS-associated coronavirus. *Arch. Virol.* 150, 1–20. doi:10.1007/s00705-004-0413-9
- Zhou, P., Cowled, C., Marsh, G.A., Shi, Z., Wang, L.-F., Baker, M.L., 2011. Type III IFN receptor expression and functional characterisation in the pteropid bat, *Pteropus alecto*. *PloS One* 6, e25385. doi:10.1371/journal.pone.0025385
- Zhou, P., Tachedjian, M., Wynne, J.W., Boyd, V., Cui, J., Smith, I., Cowled, C., Ng, J.H.J., Mok, L., Michalski, W.P., Mendenhall, I.H., Tachedjian, G., Wang, L.-F., Baker, M.L., 2016. Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- α in bats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2696–2701. doi:10.1073/pnas.1518240113
- Zhu, H.C., Chu, D.K.W., Liu, W., Dong, B.Q., Zhang, S.Y., Zhang, J.X., Li, L.F., Vijaykrishna, D., Smith, G.J.D., Chen, H.L., Poon, L.L.M., Peiris, J.S.M., Guan, Y., 2009. Detection of diverse astroviruses from bats in China. *J. Gen. Virol.* 90, 883–887. doi:10.1099/vir.0.007732-0
- Zumla, A., Hui, D.S., Perlman, S., 2015. Middle East respiratory syndrome. *The Lancet* 386, 995–1007. doi:10.1016/S0140-6736(15)60454-8